

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Leiter der HNO Forschung: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

---

**„Die Expression und Funktion des murinen EpCAM in der  
embryonalen Stammzellendifferenzierung“**

---

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Sannia Sarrach**

aus München

2013



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralph A.W. Rupp

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2014



# Eidesstattliche Versicherung

Sarrach, Sannia

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Die Expression und Funktion des murinen EpCAM in der embryonalen Stammzellendifferenzierung“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 17.12.2013

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin

Für meine Mama

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Publikationen .....	X
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Frühe Embryonalentwicklung der Maus .....	2
1.1.1 Von der Fertilisation bis zur Implantierung der Blastozyste in den Uterus.....	2
1.1.2 Gastrulation .....	6
1.2 Stammzellen.....	9
1.2.1 Embryonale Stammzellen .....	10
1.2.2 Somatische Stammzellen .....	13
1.2.3 iPS-Zellen ( <i>induced pluripotent stem cells</i> ) .....	15
1.2.4 TICS (Tumor initiating cells) .....	16
1.3 EpCAM- Epitheliales Zelladhäsionsmolekül.....	18
1.3.1 Das Gen <i>Epcam</i> .....	18
1.3.2 Das Protein EpCAM.....	20
1.3.3 Funktion von EpCAM .....	22
1.3.4 Spaltung von EpCAM.....	24
1.3.4.1 Spaltung und Signalfunktion des humanen EpCAM .....	24
1.3.4.2 Spaltung und Abbau des murinen EpCAM .....	26
1.3.5 Expressionsmuster von EpCAM .....	28
1.3.5.1 EpCAM Expression in der Embryonalentwicklung und in gesundem Gewebe .....	28
1.3.5.2 EpCAM Expression in malignem und benignem Gewebe .....	31
1.4 Zielsetzung.....	33
<b>2 Material.....</b>	<b>35</b>
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	35
2.1.1 Chemikalien und Kits .....	35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	37
2.1.3 Geräte .....	38
2.2 Antikörper.....	39
2.3 Oligonukleotide und Plasmide.....	40
2.3.1 Primer.....	40
2.3.2 Plasmide.....	42
2.4 cDNA Array „RealTime ready Custom“.....	42

2.5	Zelllinien .....	46
2.6	Mausembryos .....	46
2.7	Puffer und Stammlösungen .....	47
2.7.1	Kultivierung von ES Zellen .....	47
2.7.2	Durchflusszytometrie .....	47
2.7.3	Chromatin-Immunopräzipitation .....	47
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>49</b>
3.1	Zellkultur .....	49
3.1.1	Zellkulturbedingungen .....	49
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	49
3.1.3	Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen .....	49
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl .....	50
3.1.5	<i>in vitro</i> Differenzierung durch Generierung von <i>embryoid bodies</i> (EBs) .....	50
3.1.6	Transfektion der Stammzellen durch Nukleofektion .....	51
3.1.7	Untersuchung der Oberflächenexpression von Proteinen mittels Durchflusszytometrie .....	51
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	52
3.2.1	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	52
3.2.2	Isolation von RNA und Synthese von cDNA .....	52
3.2.3	Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	53
3.2.4	Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines cDNA Arrays .....	54
3.2.5	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) .....	54
3.3	Immunhistochemie .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
4.1	<i>In vitro</i> Differenzierung von E14TG2 $\alpha$ und deren Auswirkungen auf EpCAM und andere Marker .....	59
4.1.1	Die Generierung und Morphologie von <i>embryoid bodies</i> .....	59
4.1.2	Die Differenzierung von ES Zellen führt zu Änderungen der EpCAM Expression .....	61
4.1.3	Auswirkungen der Differenzierung auf Zellzyklus- und Proliferationsmarker .....	64
4.1.4	Epigenetische Histonmodifikationen und verändertes Bindungsverhalten von Polymerase II .....	66
4.1.5	Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in <i>embryoid bodies</i> .....	72
4.1.6	EpCAM und Vimentin Expression schließen sich gegenseitig aus .....	74
4.2	Auswirkungen einer EpCAM Überexpression auf die Differenzierung in <i>embryoid bodies</i> .....	76
4.2.1	Überexpression von EpCAM in E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF .....	77
4.2.2	EpCAM Überexpression hat keinen ersichtlichen Einfluss auf die EB Morphologie .....	78
4.2.3	EpCAM Überexpression kann eine 3D-Differenzierung der Stammzellen nicht verhindern .....	79
4.2.4	Keine Regulation von Proliferations- und Zellzyklusmarkern aufgrund ektopischer EpCAM Expression .....	83
4.2.5	Einfluss einer exogenen EpCAM Expression auf die kardiomyozitäre Differenzierung .....	84
4.2.6	Transkriptionelle Regulation von EpCAM, Oct3/4 und $\alpha$ -CAA in kontrahierenden EBs .....	88
4.2.7	Immunhistochemische Untersuchungen der EpCAM, Zytokeratin 8/18 und $\alpha$ -CAA Expression in Abhängigkeit der Kontraktion von EBs .....	92
4.3	EpCAM Expression in muriner Embryonalentwicklung .....	94
4.3.1	Expression von EpCAM in Herzanlagen und dem fötalen murinen Herz .....	96

---

4.3.2	Expressionsmuster von EpCAM in einzelnen Entwicklungsstufen der Mausembryos .....	97
4.4	Regulation von Differenzierungsmarkern in Folge von EpCAM Überexpression und Differenzierung .....	101
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>113</b>
5.1	Auswirkungen der 3D-Differenzierung auf die EpCAM Expression in murinen embryonalen Stammzellen.....	115
5.2	EpCAM hat einen Einfluss auf die <i>in vitro</i> Differenzierung .....	121
5.3	Embryonale Entwicklung mit variierender EpCAM Expression.....	126
5.4	EpCAM Überexpression hat positiven Einfluss auf die endodermale Differenzierung.....	130
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>162</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Embryonalentwicklung von der Zygote bis zur Blastozyste.....	3
Abbildung 1.2: Herkunft der drei Keimblätter.....	6
Abbildung 1.3: Schematisch dargestellte Gastrulation von Säugern. ....	7
Abbildung 1.4: Erhaltung der Pluripotenz in murinen ES Zellen. ....	12
Abbildung 1.5: Differenzierung Hämatopoetischer Stammzellen.....	14
Abbildung 1.6: Das <i>Epcam</i> Gen.....	19
Abbildung 1.7: Struktur des EpCAM Proteins.....	21
Abbildung 1.8: Spaltung und Signalkaskade des humanen EpCAM Moleküls.....	25
Abbildung 1.9: Spaltung des murinen EpCAM Moleküls. ....	27
Abbildung 1.10: EpCAM Expression in Zellen der Leber.....	30
Abbildung 4.1: Generierung von <i>embryoid bodies</i> .....	60
Abbildung 4.2: Abnahme von EpCAM und SSEA-1 an der Oberfläche von E14TG2α ES Zellen nach 21-tägiger Differenzierung in <i>embryoid bodies</i> . ....	62
Abbildung 4.3: Reduktion des Pluripotenzmarkers Oct3/4 auf transkriptioneller Ebene.....	63
Abbildung 4.4: Reduktion von EpCAM auf transkriptioneller Ebene durch Differenzierung von E14TG2α ES Zellen. ....	64
Abbildung 4.5: Einfluss von Differenzierung auf die Transkription der Cyclin D1, Ki67 und p53 Gene. ....	65
Abbildung 4.6: EpCAM Expression auf mRNA Ebene zur Kontrolle der Chromatin Immunopräzipitationsergebnisse.....	66
Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der <i>EpCAM</i> Promotorregion und der Bindestellen der in der Chromatin Immunopräzipitation verwendeten Primer. ....	68
Abbildung 4.8: Chromatin Immunopräzipitation am <i>Epcam</i> Promotor. ....	69
Abbildung 4.9: Chromatin Immunopräzipitation am <i>Oct3/4</i> Promotor.....	71
Abbildung 4.10: Immunhistochemische Färbung des EpCAM Proteins in <i>embryoid bodies</i> verschiedener Differenzierungsstadien. ....	73
Abbildung 4.11: Basolaterale EpCAM Expression am äußeren Rand der <i>embryoid bodies</i> und der Umrandung der Vakuolen. ....	74
Abbildung 4.12: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin nach viertägiger Differenzierung embryonaler Stammzellen. ....	75
Abbildung 4.13: Oberflächenexpression von EpCAM in stabilen E14TG2α Transfektanten. ....	77
Abbildung 4.14: Vergleich der Morphologien von <i>embryoid bodies</i> der Zelllinie E14TG2α- EpCAM-TF und der Kontrollzelllinie.....	78
Abbildung 4.15: Oberflächenexpression von EpCAM und SSEA-1 der Zelllinie E14TG2- EpCAM-TF nach 21-tägiger Differenzierung.....	80
Abbildung 4.16: Sinkende Expression von EpCAM im Überexpressionssystem auf transkriptioneller Ebene.....	81

---

Abbildung 4.17: Oct3/4 wird infolge der Differenzierung auch in Überexpressionszelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF auf transkriptioneller Ebene reduziert. ....	82
Abbildung 4.18: Keine Auswirkungen von ektopischer EpCAM Expression auf die Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, Ki67 und p53 während der Differenzierung. ....	83
Abbildung 4.19: Anzahl generierter <i>embryoid bodies</i> verschiedener Zelllinien. ....	85
Abbildung 4.20: Anzahl kontrahierender <i>embryoid bodies</i> in zwei verschiedenen Zellsystemen zur exogenen Expression von EpCAM. ....	87
Abbildung 4.21: Relative Oct3/4 Expression in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden <i>embryoid bodies</i> . ....	89
Abbildung 4.22: Relative EpCAM Expression in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden <i>embryoid bodies</i> . ....	90
Abbildung 4.23: $\alpha$ -CAA Expression in nicht-kontrahierenden im Vergleich zu kontrahierenden <i>embryoid bodies</i> . ....	91
Abbildung 4.24: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM, CK8/18 und $\alpha$ -CAA in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs. ....	93
Abbildung 4.25: EpCAM Expression in Schnitten von mruinen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien. ....	95
Abbildung 4.26: EpCAM Expression in Herzanlagen und dem entwickelten Herz muriner Embryonen. ....	97
Abbildung 4.27: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E9.5. ....	98
Abbildung 4.28: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E12.5. ....	99
Abbildung 4.29: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E18.5. ....	100
Abbildung 4.30: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation Stammzell-spezifischer Genen. ....	103
Abbildung 4.31: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Pluripotenz-erhaltenden Transkriptionsfaktoren. ....	104
Abbildung 4.32: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Signalmolekülen, die zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz dienen. ....	105
Abbildung 4.33: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. ....	105
Abbildung 4.34: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Trophoblast Markern. ....	106
Abbildung 4.35: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Genen exprimiert in mesodermalen Geweben. ....	107
Abbildung 4.36: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von mesodermalen und kardiomyozytären Markern. ....	108
Abbildung 4.37: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von endothelialen Markern. ....	108
Abbildung 4.38: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von endodermalen Genen. ....	109
Abbildung 4.39: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von ektodermalen und Keimzell-Markern. ....	110

Abbildung 4.40: Validierung einiger Expressionsmuster von endo-, meso- und ektodermalen Markern aus dem Differenzierungsarray. ....	111
Abbildung 5.1: Chromatin Immunopräzipitation am <i>Epcam</i> Promotor von pluripotenten Stammzellen und Zellen des fötalen und adulten Herzens (Datenbank USCS Genome Browser). ....	130



## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.....	35
Tabelle 2.2: Verwendete Kits .....	37
Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 2.4: Verwendete Geräte .....	38
Tabelle 2.5: Verwendete Primärantikörper .....	39
Tabelle 2.6: Verwendete Sekundärantikörper .....	39
Tabelle 2.7: Verwendete Primer.....	40
Tabelle 2.8: Verwendete Plasmide.....	42
Tabelle 2.9: Liste aller Gene des "RealTime ready Custom"-Arrays.....	42
Tabelle 2.10: Verwendete Zelllinien .....	46
Tabelle 3.1: qPCR Reaktionsansatz .....	53
Tabelle 3.2: qPCR Protokoll.....	53
Tabelle 3.3: qPCR Protokoll "RealTime ready Custom"-Array.....	54
Tabelle 3.4: Waschschritte ChIP.....	56

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure
b	Basen
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAA	<i>cardiac actin</i>
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre DNA
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
g	Gramm
Gusb	Glucoronidase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H3K4me3	Histon 3 methyliert an Lysin 4
H3K27me3	Histon 3 methyliert an Lysin 27
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
k	Kilo

---

kb	Kilobasen
l	Liter
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
μ	Mikro
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (Boten Ribonukleinsäure)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
Pol II	Polymerase II
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TF	Tev-Flag
TIC	<i>Tumor initiating cell</i> (Tumor initiiierende Zelle)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle
TY	Thyroglobulindomäne

## PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zu folgender Publikation beitragen:

**Imrich S**, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhesion & Migration* (2012); 6:30 - 38; PMID: 22647938; <http://dx.doi.org/10.4161/cam.18953>.

# 1 EINLEITUNG

Die größte Herausforderung der Entwicklungsbiologie ist einerseits das Begreifen von zellulärem Verhalten, das die Morphogenese antreibt, andererseits die Entdeckung von molekularen Signalen, die diese Prozesse einleiten, kontrollieren und koordinieren. Genetische Studien konnten bereits grundlegende, regulatorische Netzwerke von Genen und Schlüsselsignalwege zur Kontrolle der Differenzierung und Zellkommunikation identifizieren. Dabei stellte sich außerdem heraus, dass viele zentrale morphoregulatorische Mechanismen, wie die kollektive Zellmigration, evolutionär konserviert sind (Nowotschin and Hadjantonakis 2010). Während der frühen Embryonalentwicklung ist die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung von größter Bedeutung, um im erforderlichen zeitlichen Rahmen neben der richtigen Zellzahl, die exakte Menge an Vorläuferzellen der einzelnen Keimblätter und eine Polarität der Zellen zu gewährleisten (Takaoka and Hamada 2012, Blanpain and Simons 2013). So zeigen Prozesse wie die Gastrulation und die Generierung eines Körperplans, die bereits früh den Bauplan für die Morphogenese des Embryos festlegen (Tam and Behringer 1997), die Bedeutung des reibungslosen zeitlichen Ablaufs der Embryonalentwicklung. Auch die Allokation von extraembryonalem Gewebe, das primär für den Nährstofftransport und den Schutz des Embryos verantwortlich ist (Saiz and Plusa 2013), spielt in initialen Phasen der Entwicklung eine essentielle Rolle (Schrode *et al.* 2013). Des Weiteren ist die fehlerfreie Implantierung, verbunden mit der Entstehung der Blastozyste, deren Migration, Apposition, Anheftung, Invasion in die Uterusschleimhaut und der Entwicklung der Plazenta von großer Bedeutung für die Entstehung und Entwicklung eines Embryos (Bai *et al.* 2013). So ist bekannt, dass die Hälfte aller befruchteten, prä-implantierten Embryos von Säugern nicht terminal implantiert werden können (Wilcox *et al.* 1988). Trotz allem hat der Mensch nur ein rudimentäres Verständnis der zellulären Dynamik und morphogenetischen Mechanismen der Entwicklung (Nowotschin and Hadjantonakis 2010). Jedoch weisen die Generierung neuer

Mutanten, eine Verbesserung der *ex utero* Kultivierung, neue und verbesserte *Live Imaging* Reporter, die aktuellen Imaging Modalitäten und Datenanalyse Tools (Nowotschin and Hadjantonakis 2010), aber auch die *in vitro* Erforschung pluripotenter embryonaler Stammzellen neue Möglichkeiten und Methoden auf, diese Wissenslücken zu füllen.

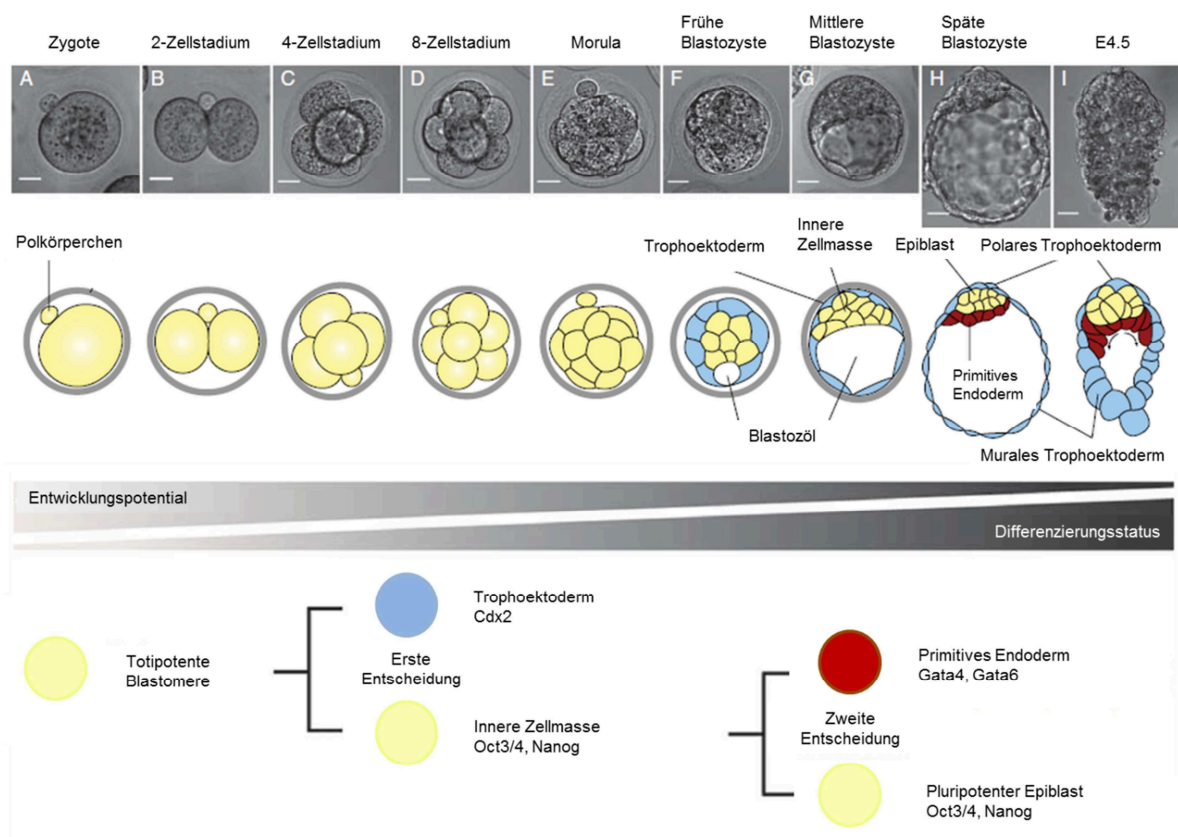
## **1.1 Frühe Embryonalentwicklung der Maus**

### **1.1.1 Von der Fertilisation bis zur Implantierung der Blastozyste in den Uterus**

Die frühe Entwicklung eines Mausembryos ist in Abbildung 1.1 dargestellt und beginnt mit der Fertilisation, dem Verschmelzen der männlichen und weiblichen Keimzelle (Johnson 2009, Saiz and Plusa 2013). Das Polkörperchen ist dabei nur das Nebenprodukt einer vorangegangenen zweiten Meiose der Oozyte, trägt zwar einen Teil des nicht mehr benötigten Erbguts, spielt aber keine Rolle in der weiteren Embryogenese und degeneriert bei Implantierung der Blastozyste (Saiz and Plusa 2013).

Dem Vorgang der Befruchtung, welcher den Prozess der Embryogenese anstößt, folgen eine Reihe von strikt regulierten Abfolgen von Ereignissen der Zelllinienspezifikation und der gleichzeitigen Entstehung embryonaler Achsen (Takaoka and Hamada 2012). So erfolgt in der 1-Zellzygote innerhalb der nächsten 24 Stunden die Replikation der DNA beider Pronuklei, gefolgt von der Fusionierung der Chromosomen. Nach Mitose und Zytokinese entsteht das 2-Zweizellstadium (Li *et al.* 2010). Die ersten sieben Zellzyklen zur Generierung der Blastozyste (auch Blastula genannt) sind Zellteilungen, die kein Wachstum, sondern eine Halbierung der Zellgröße zur Folge haben (Lehtonen 1980, Aiken *et al.* 2004). So erscheint der Blastomer, der aus der zweiten und dritten Teilung hervorgeht, beinahe symmetrisch (siehe Abbildung 1.1 (**C**, **D**)). Durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Verdichtung der Struktur, in einem verstärkten Zell-Zell-Kontakt resultierend, bildet sich die Morula (siehe Abbildung 1.1 (**E**)) (Ziomek and Johnson 1980). Bereits zu diesem Zeitpunkt erhalten die Zellen der entstandenen Morula durch die asymmetrische Lokalisation von

bestimmten Proteinen, wie beispielsweise E-Cadherin an der basolateralen Seite der einzelnen Zellen (Hyafil *et al.* 1980, Vinot *et al.* 2005), eine apikal-basale Polarität (Takaoka and Hamada 2012). Zwei weitere, diesmal asymmetrische, Zellteilungen zum 16- und 32-Zellstadium generieren zwei distinkte Zellpopulationen: die „äußeren“ Zellen und „innere“ Zellen (siehe Abbildung 1.1 (G)). Dabei entsteht aus letzteren die pluripotente Innere Zellmasse und aus den äußeren Zellen der Vorläufer des embryonalen Teils der späteren Plazenta, das Trophoektoderm (Tarkowski and Wroblewska 1967, Johnson and Ziomek 1981).



**Abbildung 1.1: Embryonalentwicklung von der Zygote bis zur Blastozyste.**

Beginnend mit einer Verschmelzung der männlichen und weiblichen Keimzelle, der Bildung der Zygote (A), entwickelt sich der frühe Embryo durch mehrere Zellteilungen und einer Verdichtung der Zellen zur sogenannten Morula (E). Die darauffolgende Entstehung von Adhäsionskomplexen erlaubt den Einstrom von Ionen und Flüssigkeit und somit die Entwicklung des Blastozöls (F, G). Die Ausbildung dieses flüssigkeitsgefüllten Hohlraums definiert die einzelnen Stufen der prä-implantierten Blastozyste (F, G, H). Nach Entstehung des extraembryonalen Trophoektoderms und der Inneren Zellmasse im mittleren Stadium (G), entwickeln sich der Epiblast, das primitive Endoderm und die extraembryonalen Zelllinien des polaren und muralen Ektoderms (H). E4.5 (I) markiert das Stadium kurz vor der Implantierung der Blastozyste in das Uterusgewebe des Muttertiers. Mit zunehmendem Grad

der Differenzierung des Embryos sind ein abnehmendes Entwicklungspotential der Zellen und ein unterschiedliches Expressionsmuster spezifischer Marker zu verzeichnen. Modifiziert nach Saiz und Plusa und Schrode *et al.* (Saiz and Plusa 2013, Schrode *et al.* 2013).

Die Bildung von Adhäsionskomplexen zwischen den Zellen des äußeren Bereichs führt zum Einstrom von Ionen und Flüssigkeit ins Innere der embryonalen Struktur. Durch diesen Prozess der Hohlraumbildung, auch Kavitation genannt, wird das Blastozöl gebildet, das charakteristisch für die frühe Blastozyste ist (Smith and McLaren 1977, Madan *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008). Außerdem ist dieser flüssigkeitsgefüllte Hohlraum zusammen mit der Lokalisation der Inneren Zellmasse an nur einer Seite des Trophoektoderms, dem sogenannten polaren Trophoektoderm, für die Asymmetrie der blastozystären Struktur verantwortlich. Die unterschiedliche Position des polaren Trophoektoderm mit der Inneren Zellmasse im Vergleich zum muralen Trophoektoderm stellt eine weitere essentielle Achse im Embryo während der Entwicklung dar (Tam and Behringer 1997). Diese erste entscheidende Entwicklung der totipotenten Blastomerzellen in entweder Zellen des Trophoektoderms oder der Inneren Zellmasse wird über die Transkriptionsfaktoren Cdx2 (Caudal-related homeobox 2), exprimiert in Ersterem, beziehungsweise die Pluripotenz-assoziierten Marker Oct3/4 (Pou5f1, Pou domain Protein) und Nanog in der Inneren Zellmasse gesteuert (siehe Abbildung 1.1). Diese drei Faktoren zeigen im Verlauf der Entwicklung von Morula zu Blastula deutliche, dynamische Schwankungen in ihrer Expression (Niwa *et al.* 2005, Dietrich and Hiiragi 2007). Während Cdx2 also vorrangig in den äußeren Zellen exprimiert wird, ist die Expression von Oct3/4 ausschließlich auf das Stadium der frühen Blastozyste (E3.0-E3.5) und die Innere Zellmasse begrenzt (Niwa *et al.* 2005). Eine Expression von Nanog ist bereits ab dem 8-Zellstadium in den Zellen zu finden und wird in den Zellen der Inneren Zellmasse und des Epiblasten aufrechterhalten. Kurz vor der Implantierung in den Uterus allerdings nimmt die Expression von Nanog ab, um bei der Gastrulation wiederhergestellt zu werden (Chambers *et al.* 2003, Mitsui *et al.* 2003, Plusa *et al.* 2008). Die zweite wichtige Entscheidung bezüglich der Zellspezifikation wird in der späten Blastozyste getroffen. Trotz der zufälligen Lokalisation der Vorläuferzellen beider Zelltypen, ist die Segregation der Inneren Zellmasse in einerseits den Epiblasten, andererseits in die Zellen des primitiven



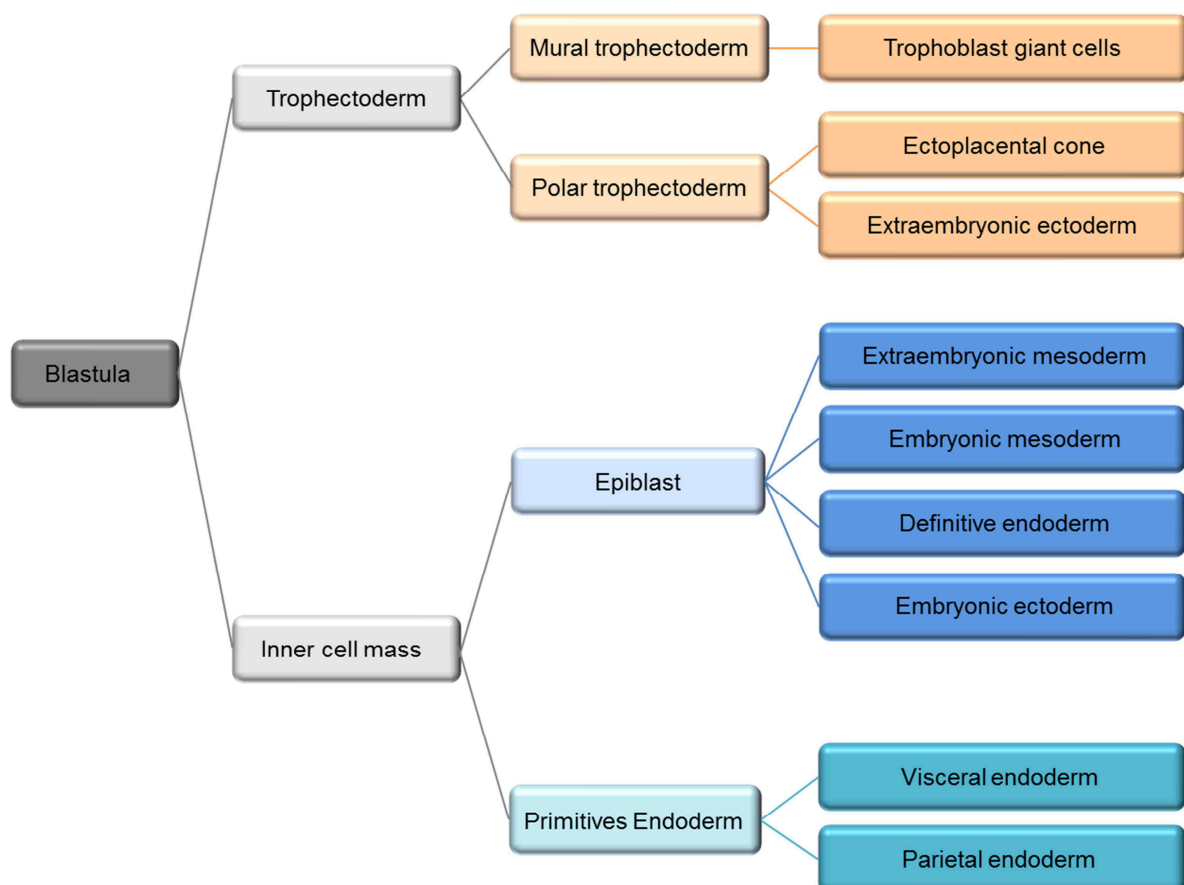
Endoderms abermals mit der differenziellen Expression spezifischer Marker, aber auch mit der unterschiedlichen Positionierung in der Blastozyste verbunden. So entwickeln sich die zum Blastozöl hin gerichteten, äußeren Zellen der Inneren Zellmasse zu Zellen des primitiven Endoderms, das sich durch die Expression von Gata4 und Gata6, zwei Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern der GATA Familie, auszeichnet. Die Zellen im Inneren dagegen bilden den Epiblasten, der weiterhin positiv für Oct3/4 und Nanog ist (Chazaud *et al.* 2006). Der Epiblast, aus dem neben der Inneren Zellmasse pluripotente embryonale Stammzelle für die *in vitro* Kultivierung isoliert werden, ist der Ursprung der drei Keimblätter und somit des späteren eigentlichen Embryos (Takaoka and Hamada 2012, Schrode *et al.* 2013).

Die Einpflanzung einer Blastozyste in den Uterus des Muttertiers ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung des Embryos und bedarf einer Vielzahl an genetischen und zellulären Interaktionsprozessen in einem definierten temporären Rahmen (Wang and Dey 2006). Diese Ereignisse sind zeitlich der Proliferation und der Differenzierung spezieller Zelltypen des Uterus angeglichen. Nicht nur Östrogene und Progesterone, sondern auch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Homeobox-Transkriptionsfaktoren und bioaktive Lipide und Morphogene sind dabei wichtig, den Uterus aufnahmefähig für die Einbettung einer Blastozyste zu machen (Carson *et al.* 2000, Paria *et al.* 2002, Dey *et al.* 2004). Doch auch die prä-implantierte Blastozyste muss „Implantierungs-Kompetenzen“ aufweisen (Wang and Dey 2006). Viele Einpflanzungen von Blastozysten werden durch unbekannte Mechanismen gehemmt. Mit Hilfe reziproker Blastozysten-Transfer-Experimente in entsprechenden Mausmodellen und einer globalen Expressionsstudie konnten zwischen implantierten und nicht-implantierten Blastozysten Unterschiede in der Expression von Genen unter anderem des Zellzyklus, von gängigen und Energie-metabolischen Signalwegen gezeigt werden (Hamatani *et al.* 2004). Der Prozess der Implantierung ist in die drei Schritte, der Apposition, des Anheftens und der Penetration, geteilt. Bei der Apposition wird das Trophoektoderm des Blastozysten in die direkte Nähe des luminalen Epithels des Uterus gebracht, um anschließend, oft mit dem muralen Trophoektoderm (Smith 1980), anzuheften. Der Verlust der Epithelzellen an dieser Stelle des Uterus initiiert eine Penetration, die eine Invasion der Blastozyste durch die

Epithelzellen und die Basalmembran ins Stroma ermöglicht, um eine vaskuläre Verbindung zwischen Embryo und Muttertier herzustellen (Wang and Dey 2006).

### 1.1.2 Gastrulation

Im Verlauf der oben beschriebenen Anheftung und Penetration besteht die späte Blastozyste weiterhin aus drei Zelltypen, dem primitiven Endoderm, dem Trophoektoderm und dem Epiblasten (siehe Abbildung 1.2). Während sich aber aus dem polaren Trophoektoderm das Gewebe des Trophoblasten mit Chorion, dem ekto-plazentalen Kegel und extraembryonalem Ektoderm entwickelt, entsteht aus dem primitiven Endoderm das viszerale und parietale Endoderm des Dottersacks (Tam and Behringer 1997, Nowotschin and Hadjantonakis 2010).

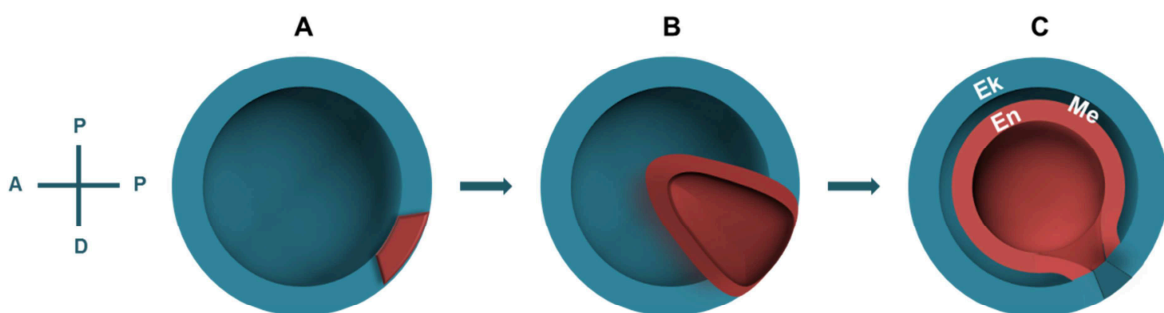


**Abbildung 1.2: Herkunft der drei Keimblätter.**

Bei Entstehung der Blastula werden zwei unterschiedliche Zelltypen generiert, pluripotente Zellen der Inneren Zellmasse (*inner cell mass*) und Zellen des Trophoektoderms. Die

Differenzierung der Zellen der *inner cell mass* führt einerseits zum Epiblasten, der den Ursprung der drei embryonalen Keimblätter und somit auch des eigentlichen Embryo darstellt, andererseits zum primitiven Endoderm. Das Trophoektoderm dagegen bildet die spätere Plazenta aus. Angelehnt an Lu *et al.* und Nowotschin und Hadjantonakis (Lu *et al.* 2001, Nowotschin and Hadjantonakis 2010).

Zusammen mit dem viszeralem Endoderm schützt das extraembryonale Ektoderm wie eine Kapsel den Epiblasten. Der Embryo beginnt sich nach dem Vorgang der Implantation zu einem radial symmetrischen Eizylinder zu vergrößern. Die Struktur scheint dem einer zweischichtigen Tasse mit einer vertikalen Achse (siehe Abbildung 1.3; proximal-distal P-D) zu ähneln. Durch die unilaterale Repositionierung der distalen Zellen des viszeralem Endoderms zu dem Bereich, an dem die Zellen des extraembryonalen Ektoderms und die des Epiblasten aufeinandertreffen, dreht sich die P-D Achse, die damit zu einer anterior-posterioren (A-P) Achse wird (Nowotschin and Hadjantonakis 2010). Embryologische und genetische Studien haben bewiesen, dass diese Rotation essentiell für die Entwicklung der A-P Achse ist (Arnold and Robertson 2009). Die Entstehung eines Gradienten bestimmter Signale (Nodal und Wnt) grenzt dabei den Bereich des *primitive streak* (PS), den ersten morphologischen Bruch der bilateralen Symmetrie, ein.



**Abbildung 1.3: Schematisch dargestellte Gastrulation von Säugern.**

Der Prozess der Gastrulation, beginnend mit der Einwanderung von Zellen (rot) der Blastozyste (A), endet mit der Bildung der Gastrula (C). Dabei entstehen die drei Keimblätter Endo- (En), Meso- (Me) und Ektoderm (Ek). Die beiden für die Entwicklung wichtigen

---

Achsen, proximal-distal (P-D) und anterior-posterior (A-P), sind ebenfalls dargestellt. Angelehnt an [http://en.wikipedia.org/wiki/Germ\\_layer](http://en.wikipedia.org/wiki/Germ_layer).

Das PS, das sich im Epiblasten, an der Grenze zum extraembryonalen Ektoderm ausbildet, definiert nicht nur den hinteren Bereich des späteren Embryo, sondern gibt exakt die Stelle der Gastrulation an (Nowotschin and Hadjantonakis 2010). Durch ihre Verlängerung, ihrer Veränderung der Morphologie, dem Verlust der apikal-basalen Polarität, aber auch der Adhäsionsproteine dringen die Zellen am PS in das Blastozöl ein. Der Abbau von Membranproteinen ist der Auslöser der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT), in der Zellen ihren epithelialen Phänotyp verlieren und zu lockerem Mesenchym differenzieren (Rivera-Perez *et al.* 2003, Mikawa *et al.* 2004, Migeotte *et al.* 2010, Nowotschin and Hadjantonakis 2010). EMT ist neben der Gastrulation noch in zwei weiteren Entwicklungsprozessen, der Entstehung des Herzens und der Ablösung der Neuralleiste, zu finden (Lim and Thiery 2012). Die neuentstandenen, mesodermalen Zellen migrieren, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** durch die Invagination einer epithelialen Zellschicht (in der Abbildung rot), die aus einer Struktur mit zwei Keimblättern einen Embryo mit drei Schichten und extraembryonalen Zelltypen generiert (Tam and Behringer 1997). Die miteinander verbundenen Zellen unterliegen während der Gastrulation einer kurzen Migration, wobei diese nicht durch deren Bewegungen selbst, sondern durch die Repositionierung der embryonalen mesodermalen Zellen ausgelöst wird (Kurosaka and Kashina 2008). Dabei ist das extraembryonale Mesoderm, das später das Mesoderm des Dottersacks, das Chorion und die Blutinseln ausbildet, die erste aus dem Epiblasten gebildete Zelllinie. Im Verlauf der Gastrulation und Differenzierung aber werden außerdem noch das mesenchymale embryonale Mesoderm und das definitive Endoderm gebildet (siehe Abbildung 1.2) (Lu *et al.* 2001, Nowotschin and Hadjantonakis 2010, Saiz and Plusa 2013).

Der programmierte Zelltod (Apoptose) im Epiblasten spielt keinerlei morphogenetische Rolle in der Gastrulation, (Poelmann 1980). Die aktive Proliferation und die Erlangung einer bestimmten Anzahl an Zellen im Epiblasten sind dagegen äußerst wichtig für die Initiation und das Fortlaufen der Gastrulation. So wird

der Vorgang nicht eingeleitet, wenn eine nicht ausreichend hohe Zellzahl erreicht wurde (Snow and Tam 1979, Tam 1988).

## 1.2 Stammzellen

Die Experimentelle Entwicklungsbiologie zeigte in Säugern eine Differenzierung und Proliferation der frühen Zygote in alle Zelllinien des Embryos, des Fötus und des späteren adulten Organismus. Diese Prozesse unterliegen enorm starken regulativen Mechanismen und ließen davon ausgehen, dass bereits sehr früh in der Embryogenese Zellen mit hohem Differenzierungspotential existieren müssen (Evans 2011). Sie wurden aus embryonalem Gewebe isoliert und als sogenannte pluripotente Stammzellen, mit der Fähigkeit in alle Zelltypen zu differenzieren, bezeichnet (Evans and Kaufman 1981, Martin 1981). Neben embryonalen Stammzellen (ES Zellen) aus nicht-implantierten Embryos, wurden zwei weitere pluripotente Stammzelllinien identifiziert. Während aus testikulären Tumoren embryonale Karzinomzellen (EC) isoliert wurden, entstammten primordiale Keimzellen (PGCs) aus bereits in den Uterus der Mutter implantierte Embryos (Donovan and Gearhart 2001, Boiani and Scholer 2005). ES Zellen weisen gegenüber multipotenten, adulten oder auch Gewebestammzellen Vorteile wie beispielsweise die leichtere Identifizierung, Isolierung und die unbegrenzte Kultivierung und ihre Pluripotenz auf, die eine Nutzung als Reservoir für Vorläuferzellen ermöglicht (Boiani and Scholer 2005). Ein Meilenstein hinsichtlich therapeutischer und regenerativer Therapien, führte in den letzten Jahren dazu auch den umgekehrten Prozess der Reprogrammierung somatischer Zellen zu pluripotenten Zellen, *induced pluripotent stem cells* (iPS Zellen), zu untersuchen, ohne ethischen Bedenken gegenüberstehen zu müssen (Zhou *et al.* 2013). Auch in malignen Transformationen wurden Zellen mit Stammzell-ähnlichen Charakteristika, wie Selbsterneuerung, und der Fähigkeit gefunden, in viele phänotypisch unterschiedliche Tumorzellen zu differenzieren. Diese Zellen werden unter anderem Tumor-initiierende Zellen (TICs) oder Krebsstammzellen (CSCs) genannt (Al-Hajj *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Clevers 2011).

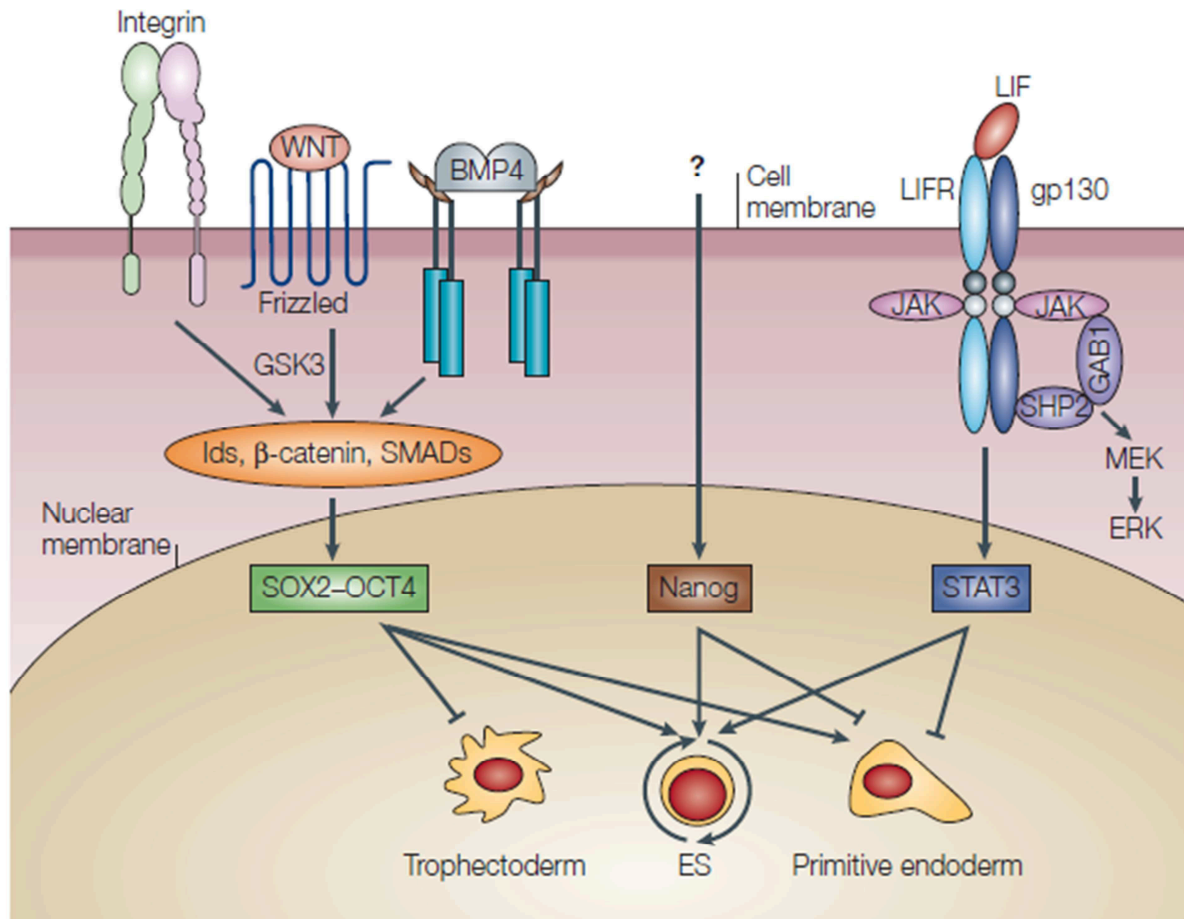
### 1.2.1 Embryonale Stammzellen

ES Zellen werden aus der Blastozyste, genauer aus der Inneren Zellmasse oder dem Epiblasten, prä-implantierter Embryonen isoliert (Evans and Kaufman 1981, Schrode *et al.* 2013) und zeichnen sich durch die charakteristischen Eigenschaften der Pluripotenz und Selbsterneuerung aus. Die Pluripotenz ermöglicht es den ES Zellen, wie in Abschnitt 1.1 detailliert beschrieben, in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Enver *et al.* 2009), bei einer Retransplantation in eine Blastozyste zu integrieren und dabei einen chimären Embryo zu generieren (Nagy *et al.* 1993, Gardner and Brook 1997, Boiani and Scholer 2005). Bereits 1954 aber postulierten Stevens und Little, dass nicht alle ES Zellen zu differenzieren begannen, sondern die Zellen ihren undifferenzierten Status teilweise erhielten (Stevens and Little 1954). Dies sollte später als die asymmetrische Teilung einer Zelle in zwei morphologisch und charakteristisch unterschiedliche Tochterzellen beschrieben werden, die die Selbsterneuerung und Differenzierung der ES Zellen balanciert. Dieser Mechanismus ermöglicht nicht nur die Aufrechterhaltung, der Stammzell-Population, sondern erlaubt außerdem die Wahrung der Homöostase von Geweben und die Suppression von Tumorbildung (Inaba and Yamashita 2012). Die zugrundeliegenden Mechanismen der asymmetrischen Teilung wurden hauptsächlich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* untersucht und unterliegen zum einen intrinsischen, zum anderen extrinsischen Regulationen. Während in intrinsischen Prozessen die Teilung in zwei unterschiedliche Tochterzellen aufgrund graduell exprimierter Signale und Faktoren eingeleitet wird (Betschinger and Knoblich 2004, Yu *et al.* 2006), so ist die Asymmetrie der Zellen extrinsisch durch die Positionierung in verschiedene Mikroumgebungen reguliert (Li and Xie 2005, Inaba and Yamashita 2012). Verschiedene Proteine an der Oberfläche und im Kern erleichtern die Isolierung und Charakterisierung pluripotenter ES Zellen, da sie in differenzierten Zellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert sind. So wird *in vitro* die Expression von Nanog beispielsweise im Verlauf der Entwicklung sehr schnell abgeschaltet (Singh *et al.* 2007). In murinen ES Zellen gehören zu den Stammzell-spezifischen Proteinen das Glykoprotein SSEA-1 und die Marker Oct3/4 (*octamer binding protein*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*), c-Myc, Nanog und Sox2 (Solter and

Knowles 1978, Okamoto *et al.* 1990, Yoshida *et al.* 1994, Chambers *et al.* 2003, Boiani and Scholer 2005). Auch die enzymatische Aktivität der Telomerase und der alkalinen Phosphatase (AP) ist ein essentieller Bestandteil des pluripotenten Phänotyps (Wobus *et al.* 1984, Thomson *et al.* 1998, Boiani and Scholer 2005). Die Funktion der Proteine für die Zelle aber geht weit über die Isolierung und Identifizierung hinaus. So ist die Erhaltung der Pluripotenz muriner ES Zellen an ein regulatorisches Netzwerk der Proteine Oct3/4, Nanog und Sox2, geknüpft (Rosner *et al.* 1990, Niwa *et al.* 2000, Chambers *et al.* 2003, Mitsui *et al.* 2003, Boyer *et al.* 2005, Jaenisch and Young 2008, van den Berg *et al.* 2010). *In vitro* aber ist das Schlüsselzytokin zur Bewahrung des Stammzell-Phänotyps muriner ES Zellen der *leukemia inhibitory factor* (LIF), ein Mitglied der Interleukin-6 Familie (Hirai *et al.* 2011). Deshalb werden isolierte ES Zellen entweder auf sogenannten *feeder* Zellen, die das Zytokin produzieren und sezernieren, oder unter Zugabe von LIF ins Medium kultiviert (Smith *et al.* 1988, Williams *et al.* 1988, Matsuda *et al.* 1999). In rechten Teil der Abbildung 1.4 ist schematisch die Signaltransduktion durch das Zytokin LIF dargestellt.

Durch die Bindung des Liganden LIF an seinen Rezeptor LIFR kommt es zu einer Aktivierung und der Entstehung eines trimären Komplexes mit dem Transmembranprotein gp-130. Die Phosphorylierung des LIF-LIFR-gp-130 Komplexes durch JAK (*Janus tyrosine kinase*) und TIK (*antiphosphotyrosine immunoreactive kinase*) ermöglicht es Proteinen, wie STAT3, mit einer SHP2- (*Src-homology-2*) Domäne zu binden. Durch diese Interaktion kann STAT3 selbst phosphoryliert werden und als Dimer in den Kern translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor die Genregulation steuert. Bisher ist ausschließlich dieser Signalweg zur Pluripotenzerhaltung detailliert geklärt (Boiani and Scholer 2005). Jedoch konnte experimentell gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT3 ausreichend war, um die Selbsterhaltung zu bewahren (Matsuda *et al.* 1999). Obwohl es im Verständnis um BMP4 (*bone morphogenic protein 4*) und seinem Mitwirken an der Pluripotenz- und Selbsterhaltung muriner ES Zellen viele Lücken gibt, ist dennoch bekannt, dass BMP4 im Beisein von LIF den Prozess der Erhaltung der Pluripotenz und Selbsterneuerung unterstützt und verbessert, indem es durch die Aktivierung des

*SMAD4* Gens (*similar to mothers against decapentaplegic homologue-4*) indirekt die Mitglieder der Id- (*inhibitor of differentiation*) Familie anschaltet (Ying et al. 2003).



**Abbildung 1.4: Erhaltung der Pluripotenz in murinen ES Zellen.**

Durch die Bindung von Liganden an Oberflächenrezeptoren werden Signale in den Nukleus gesandt, die dort Pluripotenzfaktoren, wie Oct3/4, und Transkriptionsfaktoren zur Selbsterneuerung, wie Nanog oder STAT3, regulieren. Bisher wurde nur der LIF- (*leukemia inhibitory factor*) Signalweg näher untersucht. Die Bindung von LIF an seinen spezifischen Rezeptor LIF-R und die darauffolgende Heterodimerisierung des Rezeptors mit dem Transmembranprotein gp-130 initiiert die Signalkaskade. Im Folgenden werden Kinasen aktiviert, die die Übertragung des Signals in den Kern oder die Rekrutierung anderer Proteine vermitteln, die eine Bindung an den LIFR-gp130 Komplex erlauben. Die Phosphorylierung des Komplexes durch JAK (*Janus tyrosine kinase*) und TIK (*antiphosphotyrosine immunoreactive kinase*) erlaubt die Bindung von Proteinen mit einer SHP2- (*Src-homolgy-2*) Domäne, wie beispielsweise STAT3. Nach Phosphorylierung von STAT3 erfolgt die Dimerisierung und Translokation in den Nukleus. Als Transkriptionsfaktor übernimmt das Dimer dort die Aktivierung und Regulierung von Pluripotenz-spezifischen Genen. Sox2-Oct3/4, Nanog und STAT3 führen zu Regulationen, die positiv (Linien mit Pfeil) oder negativ (beendete Linien) für die Expression verschiedener Gene sind. Das Fragezeichen stellt einen unbekannten Rezeptor dar. Abbildung aus Boiani und Scholer (Boiani and Scholer 2005).



Auch der Wnt-Signalweg ist in die Erhaltung des Stammzell-Phänotyps involviert. So wird der Rezeptor Frizzled von dem Wnt-Protein gebunden, was eine Inhibierung der GSK3 (Glykogensynthase Kinase 3) und eine darauffolgende Akkumulierung von nukleärem  $\beta$ -Catenin und die Expression von Zielgenen zur Folge hat (Boiani and Scholer 2005).

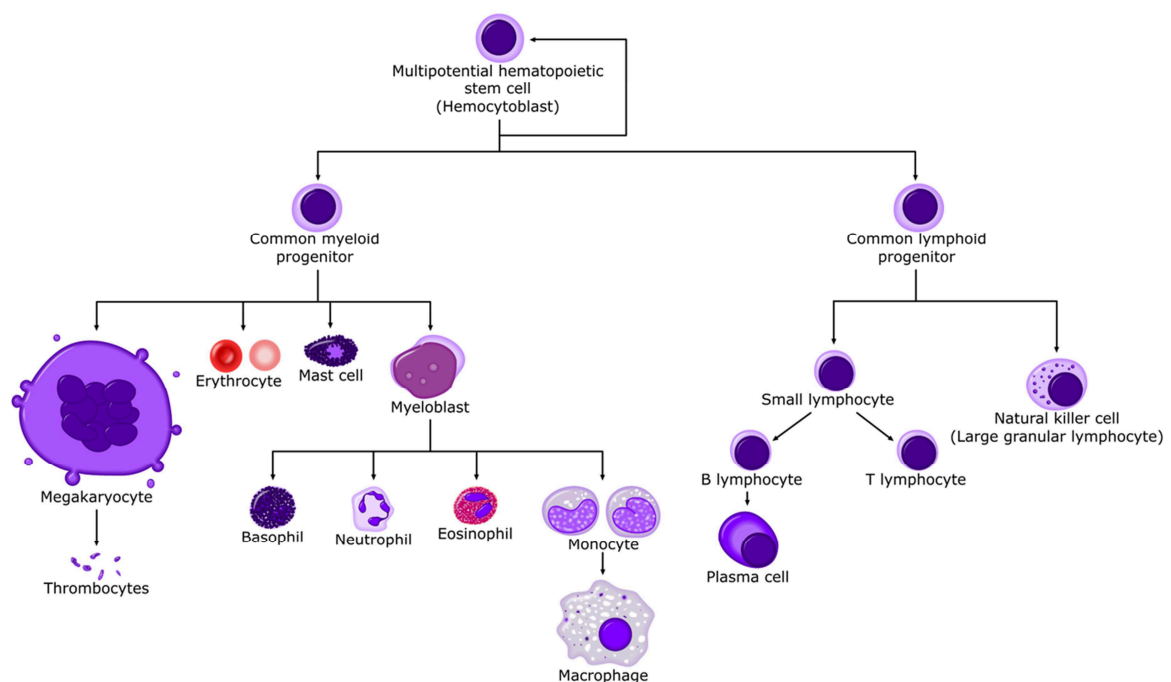
Da die Arbeit mit humanen ES Zellen in Europa strikt reglementiert ist (Salter and Salter 2007) wird häufig auf murine ES Zellen zurückgegriffen. Sie sind leicht durch molekularbiologische Methoden zu modifizieren (Thomas and Capecchi 1987) und werden daher eingesetzt, um transgene Mäuse zu generieren und einzelne Gene zu untersuchen (Evans 2011). Einige Tiermodelle konnten außerdem zeigen, dass die Transplantation von spezifisch differenzierten ES Zellen erfolgreich waren. So konnten beispielsweise aus *in vitro* kultivierten Kardiomyozyten stabile, funktionelle Herztransplantate für Mäuse hergestellt werden (Klug *et al.* 1996). Des Weiteren sind seit längerem ES Zellen als potenzielle Therapeutika in der Zell-basierten Behandlung von Diabetes mellitus, der neurodegenerativen Krankheit Parkinson und der Herzmuskelreparatur in der Diskussion (Chhabra and Brayman 2013, Gallicano 2013, Sheng *et al.* 2013, Steward *et al.* 2013).

### 1.2.2 Somatische Stammzellen

Somatische oder auch adulte Stammzellen können aus vielen verschiedenen adulten Geweben, wie dem Knochenmark, dem Fettgewebe, der Nabelschnur oder dem Bindegewebe der Haut isoliert (Pittenger *et al.* 1999, Zuk *et al.* 2001, Jiang *et al.* 2002, Bieback *et al.* 2004) und mit Hilfe von spezifischen Oberflächenmarkern selektioniert werden. Sie sind multipotent, können also nicht, wie ES Zellen, in alle drei Keimblätter, jedoch in spezifische Gewebezellen differenzieren (Raff 2003, Aguilar-Gallardo and Simón 2013). Wie bei pluripotenten Stammzellen aber erfolgt die Zellteilung asymmetrisch, um eine multipotente somatische Stammzelle und eine Zelle im ruhenden Übergangszustand, mit begrenzter Teilungsfähigkeit zu erzeugen. Dies ermöglicht die Erhaltung der Homöostase und die Reparatur eines Gewebes (Forbes *et al.* 2002, Sharpless and DePinho 2007). Durch eine Verletzung des Gewebes oder nach einem bestimmten zeitlichen Intervall findet eine sehr stringent regulierte Aktivierung dieser ruhenden Zellen statt (Aguilar-Gallardo and Simón

2013). Ein Nachteil gegenüber ES Zellen ist die *in vitro* beschränkte Proliferationskapazität (Wang *et al.* 2005, Trounson 2006), die ihre Verwendung in der Forschung, aber auch den therapeutischen Einsatz limitiert. Dafür zeichnen sich somatische Stammzellen aber durch Plastizität, die Fähigkeit in verschiedene Zelllinien des gleichen oder unterschiedlicher Keimblätter zu differenzieren, aus (Aguilar-Gallardo and Simón 2013).

Die meisten Publikationen und Untersuchungen bezüglich somatischer Stammzellen, deren Charakteristika und klinischer Nutzbarkeit drehen sich um Hämatopoetische Stammzellen (HSC). Diese und die aus ihnen entstandenen Zellen sind im adulten Organismus stündlich für die Entstehung von roten und weißen Blutzellen, von Blutplättchen und anderen maturen Blut- und Immunzelllinien, wie B- und T-Zellen oder Makrophagen verantwortlich (siehe Abbildung 1.5) (Wang and Wagers 2011). Hämatopoetische Zellen sind mit Hilfe einer Kombination aus Zelloberflächenmarkern selektionierbar (Wang and Wagers 2011). So ist CD34 ein Marker humaner HSC, der aber auch auf vielen Vorläuferzellen zu finden ist (Larochelle *et al.* 1996).



**Abbildung 1.5: Differenzierung Hämatopoetischer Stammzellen.**

Hämatopoetische Stammzellen werden aus dem Knochenmark isoliert, wo sie von Stromazellen umgeben sind. Die asymmetrische Teilung der hämatopoetischen Stammzelle ermöglicht eine Balance der Homöostase und der Differenzierung zu den vom Körper

benötigten Blut- und Immunzellen. Abbildung aus [www.allthingsstemcell.com](http://www.allthingsstemcell.com) ("STEM CELL REVOLUTIONS" by Scottish Documentary Institute).

Um malignes oder dysfunktionales Gewebe zu substituieren, werden HSC schon lange in Knochenmarktransplantationen als Therapie gegen diverse Leukämien, aplastische Anämien oder Thalassämien genutzt (Gratwohl *et al.* 2002, Verfaillie 2002).

### 1.2.3 iPS-Zellen (*induced pluripotent stem cells*)

Die Pluripotenz von ES Zellen macht sie zu einer biologischen Ressource in der regenerativen Medizin. Daher war die somatische Reprogrammierung ein Durchbruch in der Wissenschaft, der, durch die *in vitro* Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), ethische Probleme hinsichtlich der therapeutischen Verwendung von embryonalen Stammzellen zu überwinden half (Kim *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2013). 2006 konnten in einer revolutionären Studie erstmals durch die ektopische Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren adulte, murine Gewebezellen zu iPS Zellen reprogrammiert werden (Takahashi and Yamanaka 2006b). Ein Jahr später folgte die Generierung humaner iPS Zellen, indem dermale Fibroblasten aus dem menschlichen Organismus unter Verwendung von retroviralen Vektoren mit den Transkriptions- oder Yamanaka Faktoren Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc transduziert wurden (Takahashi *et al.* 2007). Die Entdeckung der Reprogrammierung von adulten somatischen Zellen zu pluripotenten Stammzellen war von derartiger Bedeutung, dass Dr. Yamanaka 2012 hierfür der Nobelpreis verliehen wurde (MLAStyle, Takahashi and Yamanaka 2006a, Takahashi *et al.* 2007). Parallel dazu induzierte auch eine amerikanische Arbeitsgruppe die Reprogrammierung humaner somatischer zu pluripotenten Stammzellen, verwendete dabei allerdings statt Klf4 und c-Myc die Faktoren Nanog und LIN28 in einem lentiviralen Vektorsystem (Yu *et al.* 2007). Nach initialen genetischen Untersuchung aber wurde deutlich, dass ausschließlich die Yamanaka Faktoren wichtig für die Generierung von iPS Zellen waren (Fernandez Tde *et al.* 2013). Interessanterweise konnten unter anderem Lu *et al.* eine positive Beeinflussung des murinen und humanen ES Zell Markers EpCAM (Choo *et al.* 2008, Gonzalez *et al.* 2009, Ng *et al.* 2010) auf die Effizienz der iPS Generierung

beobachten (Lu *et al.* 2010, Huang *et al.* 2011). So korrelierte der Vorgang der Reprogrammierung nicht nur mit dem Anstieg des Proteins, sondern konnte mit einer exogenen Expression von EpCAM in den Zellen gesteigert werden. Die Inhibition von EpCAM hatte den gegenteiligen Effekt (Huang *et al.* 2011). Mit all dem Wissen um die Eigenschaften und die Expressionsplastizität von EpCAM wurde dem Protein daher eine Rolle in der Induktion und der Erhaltung des Phänotyps von Stammzellen, Gewebevorläuferzellen, iPS- und Krebszellen, aber auch TICs zugesprochen (Imrich *et al.* 2012).

Zwar ähneln reprogrammierte Zellen im Expressionsmuster ihrer Gene, in der Zellbiologie und in phänotypischen Charakteristika pluripotenten ES Zellen (Kim *et al.* 2011), jedoch ist die genomische Instabilität in frühen Passagen der *in vitro* Kultivierung häufiger (Laurent *et al.* 2011). Möglicherweise ist der Grund dafür die Inaktivierung des Proteins p53, das normalerweise sowohl für die Proliferation, wie auch den Prozess der DNA Reparatur aufgrund von Schäden verantwortlich ist. So wird die Reprogrammierung bei bereits bestehenden DNA Schäden abgebrochen (Marion *et al.* 2009). Zusätzlich zu diesem nachteiligen Aspekt führt Fernandez *et al.* auch das erhöhte Risiko der Tumorentstehung negativ auf (Fernandez Tde *et al.* 2013).

Trotzdem sind diese *in vitro* generierten Zellen mit pluripotentem Phänotyp ein einzigartiges Instrument, um die Entwicklungsbiologie des Menschen und genetische Fehlfunktionen zu untersuchen und zu behandeln, aber auch Medikamentenentwicklung und Zell-basierte Transplantationstherapien voranzutreiben (Hanna *et al.* 2007, Cherry and Daley 2012).

#### **1.2.4 TICS (Tumor initiating cells)**

Die Tumorentstehung kann durch zwei grundlegende Modelle erklärt werden. Das stochastische oder klonale Evolutionsmodell gibt die akkumulierenden Mutationen in somatischen Zellen als Ursache für eine starke, unkontrollierte Proliferation und damit einhergehende Transformation des Gewebes an (Hanahan and Weinberg 2000). Dagegen postuliert das hierarchische Modell die Existenz einer Subpopulation von Zellen, die eine Induktion der Tumorentstehung ermöglichen (Visvader and Lindeman 2008, Bhajee *et al.* 2012). Bestärkt wurde diese Hypothese durch verschiedene

Versuche in Mausmodellen der Xenotransplantation. So wurden den Tieren wenige Tumorzellen transplantiert, die den Orginaltumor nachbildeten (Li *et al.* 2007b, O'Brien *et al.* 2007, Visvader and Lindeman 2008, Rosen and Jordan 2009, Wang *et al.* 2013). Diese sogenannten Tumor-induzierenden Zellen (TIC) oder Krebsstammzellen (CSC) werden über ihre Eigenschaften bezüglich der Selbsterneuerung und der Multipotenz, also ihres Differenzierungspotentials, charakterisiert (Visvader and Lindeman 2008). Darüber hinaus werden die Zellen durch ähnliche Signalwege wie Stammzellen reguliert (Reya *et al.* 2001). So wird die Selbsterhaltung und Multipotenz über die Wnt/ $\beta$ -Catenin-, Sonic Hedgehog und Notch Signalwege reguliert (Taipale and Beachy 2001, Medina *et al.* 2009, Takebe *et al.* 2011a, Takebe *et al.* 2011b). Dies führte zur Theorie, dass TICs aus ursprünglich gesunden Stammzellen hervorgingen (Sawyers *et al.* 1991, Sell and Pierce 1994). Aktuell aber geht man davon aus, dass TICs Vorläufer- und maturen Gewebszellen (McCulloch and Till 2005, Hermann *et al.* 2007, Kelly *et al.* 2007, Trosko 2009, Nguyen *et al.* 2012) oder sogar Zellfusionierungen (Lu and Kang 2009) entstammen. Die Isolation und Selektion von TICs wird üblicherweise anhand von Kombinationen aus Markern, wie beispielsweise CD44, CD133, Nestin oder auch EpCAM erreicht (Lobo *et al.* 2007, Gires 2011). Einige Marker, wie EpCAM werden zur Isolierung von TICs aus einem breiten Spektrum an Tumoren herangezogen (Gires 2011). In hepatozellulären Karzinomen (Yamashita *et al.* 2009), in Karzinomen des Pankreas (Li *et al.* 2007a, Bolos *et al.* 2009), des Kolons (Reya *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Dylla *et al.* 2008) und der Brust (Reya and Clevers 2005, Martowicz *et al.* 2013) beispielsweise wird EpCAM als Marker für die Identifizierung von TICs verwendet.

TICs sprechen schlechter oder gar nicht auf konventionelle Therapien wie Chemo- oder Strahlentherapie an und das Wiederscheinen des Tumors und der Rückfall eines Krebspatienten sind daher wahrscheinlich auf diese Zellen zurückzuführen (Richard *et al.* 2013). Es gibt einige Gründe dafür, warum TICs nicht oder nur marginal auf Standard-Krebstherapien reagieren (Hermann *et al.* 2010, Mueller *et al.* 2010). Chemo- oder Strahlentherapie, die eine zielgerichtete Behandlung stark proliferierender Zellen darstellen, ist bei der niedrigen Proliferationsrate und dem beinahe ruhenden Zustand der Zellen (Yi *et al.* 2013) nicht erfolgversprechend. So konnte nach einem therapeutischen Eingreifen eine erhöhte Anzahl von TICs (Dylla

*et al.* 2008, Frame and Maitland 2011, Nicolini *et al.* 2011a, Nicolini *et al.* 2011b) und ein damit verbundener Rückfall festgestellt werden (Chumsri *et al.* 2007). Klassische, medikamentöse Ansätze mit Chemotherapeutika konnten aufgrund von *Multidrug-Resistance* Pumpen in den TICs nicht verfolgt werden (Moitra *et al.* 2011). Die bevorzugte Lage der Zellen in hypoxischen Mikroumgebungen machte außerdem eine erfolgreiche Anwendung von Angiogenese-Hemmern, beispielsweise Bevacizumab (*vascular endothelial growth factor (VEGF) neutralizing antibody*), durch eine abermalige Vermehrung der TICs unmöglich (Chau and Figg 2012). Hinweisen zufolge ist die Mikroumgebung, durch ihre Fähigkeit den Zellen die Selbsterneuerung und Differenzierung zu Vorläuferzellen zu ermöglichen, sehr wichtig für TICs. Deshalb würde eine Störung dieser Nische nicht nur die Homöostase der Zellen, sondern auch das Tumorwachstum unterbinden (Li and Xie 2005, Yang and Wechsler-Reya 2007, Saini and Shoemaker 2010) und sich möglicherweise als geeignete Strategie in der Bekämpfung der Tumorentstehung und –wiederkehr erweisen (Yang and Wechsler-Reya 2007, Burness and Sipkins 2010, Saini and Shoemaker 2010).

## 1.3 EpCAM- Epitheliales Zelladhäsionsmolekül

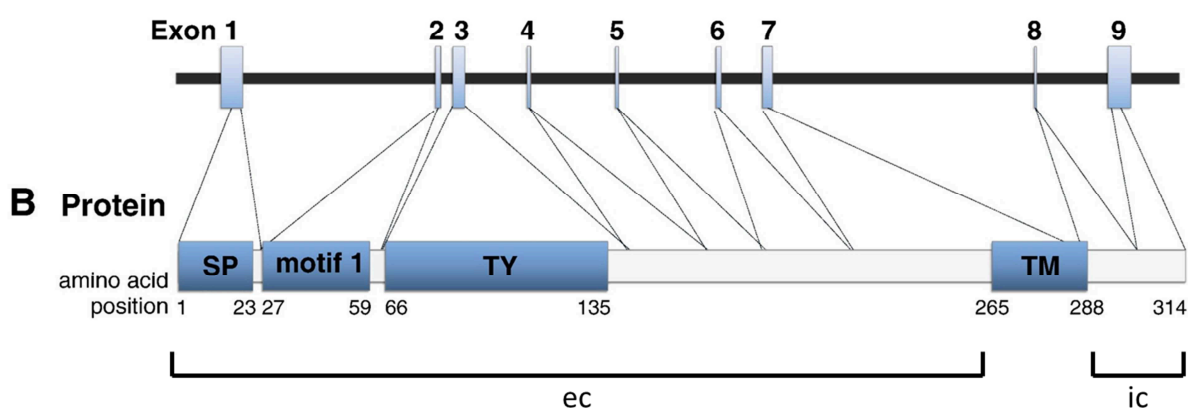
### 1.3.1 Das Gen *Epcam*

Das EpCAM-kodierende Gen *TACSTD1* ist Mitglied der Genfamilie GA-733 (Szala *et al.* 1990, Alberti *et al.* 1994) und hebt sich durch seine hohe Konservierung der Sequenz verschiedener Spezies, darunter Maus, Ratte und Mensch, hervor. So weisen die murinen und humanen Orthologe des *Epcam* Gens eine Homologie von 80 Prozent (Bergsagel *et al.* 1992). Mit dem murinen Gen auf Chromosom 17 und dem humanen auf Chromosom 2 auf (Szala *et al.* 1990, Alberti *et al.* 1994) aber variiert die chromosomale Lokalisation.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der weitaus genauer untersuchten Struktur soll im Folgenden auf den Aufbau des humanen Gens eingegangen werden (siehe Abbildung 1.6). Das *Epcam* Gen umfasst 17,7 kb und besteht aus sieben translatierten und zwei untranslatierten Exonen. Das erste Exon kodiert für einen

essentiellen Teil des späteren Proteins, das Signalpeptid, ohne das weder die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER), noch der Golgi-vermittelte Transport an die Membran der Zelle möglich ist. Den extrazellulären Teil des Proteins mit den EGF (*epidermal growth factor*) und Thyroglobulin (TY) Domänen, wie auch eine Cystein-arme Region kodieren die Exone 2 bis 6. Die Transmembrandomäne wird von dem darauffolgenden Exon, die kleine intrazelluläre Domäne mit Stopp-Kodon von Exon 8 und 9 kodiert. Exon 9 stellt dabei ein untranslatiertes Exon des *Epcam* Gens dar. Der kodierende Teil der insgesamt 1,5 kb langen mRNA umfasst 945 kb (Balzar *et al.* 1999b).

### A Chromosome 2



### Abbildung 1.6: Das *Epcam* Gen.

Das *Epcam* Gen (A) bestehend aus neun Exonen, kodiert im Protein (B) für das Signalpeptid (SP), den extrazellulären Teil (ec), mit EGF- (*epidermal growth factor*, in der Abbildung *motif 1*) und Thyroglobulin-ähnlicher Domäne (TY), und für die Transmembran- (TM) und der intrazellulären Domäne (ic). Verändert nach Schnell *et al.* (Schnell *et al.* 2013a).

Die bisher einzige bekannte Mutation des humanen Gens *Epcam* ist eine homozygote G→A Substitution an der Donor-Splice-Site des Exons 4 in Patienten mit einer genetischen Darmkrankheit namens *Congenital Tufting Enteropathy* (CTE). Dieser Basenaustausch führt molekular zu einer divergenten Isoform von EpCAM, phänotypisch zu einer Dysplasie, einer damit einhergehenden schwerwiegenden Malabsorption und einer hohen Sterblichkeit (Sivagnanam *et al.* 2008).

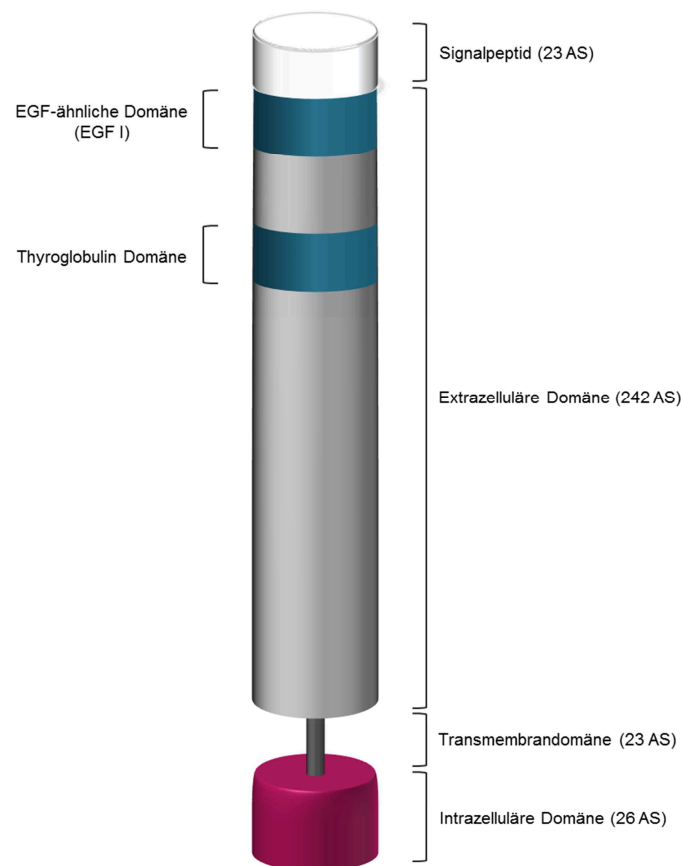
Während der Promotorbereich 177 bp 5' vor dem Start-Kodon dem Gen eine Epithel-spezifische Expression verlieh, wies der Bereich 687 bp vor der 5' flankierenden

Sequenz die höchste Aktivität auf (McLaughlin *et al.* 2004). Im Promotorbereich wurden außerdem Konsensus-Bindestellen für Inr (Initiator), SP-1, Ap-1, Ap-2, Ets ESE-1 und E-par-like (HLH) Transkriptionsfaktoren (TF) identifiziert. Weiterhin hat die Bindung von NFκB, TNFα und INFγ an ihre Rezeptoren einen negativen (Gires *et al.* 2001, Gires *et al.* 2003), die Interaktion von TCF/LEF einen positiven Einfluss auf die Transkription des EpCAM-Gens (Yamashita *et al.* 2007). Im Bereich des Promotors wurden weder eine TATA- noch eine CAAT- Box gefunden (Linnenbach *et al.* 1993).

### **1.3.2 Das Protein EpCAM**

Das EpCAM Protein aus der Familie der Zelladhäsionsmoleküle (CAM), bestehend aus 314 Aminosäuren (AS), kann in drei Bausteine unterteilt werden: Das Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Teil (Balzar *et al.* 1999b, Gires 2008). Beginnend am N-Terminus des Polypeptids (siehe Abbildung 1.7) stellen die ersten 23 AS die Signalsequenz dar, die vermutlich nach dem Transport des Moleküls ins ER und an die Plasmamembran der Zelle von Signalpeptidasen zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 abgespalten wird (Strnad *et al.* 1989, Szala *et al.* 1990, Chong and Speicher 2001). Analysen N-terminaler Sequenzierungen zeigten auch eine minimale Wahrscheinlichkeit (1%) der Spaltung nach AS 21 (Chong and Speicher 2001). Der Signalsequenz folgt die extrazelluläre Domäne aus 242 AS mit zwei verschiedenen Motiven an den Positionen 27-59 und 66-135 (Gires 2008). Postulierten Balzar *et al.* 1999 noch, dass beide EGF-ähnliche Motive darstellen (Balzar *et al.* 1999b), so konnte kurze Zeit später das zweite Motif (66-135) als Thyroglobulindomäne (TY) Typ 1a bestätigt werden (Chong and Speicher 2001, Baeuerle and Gires 2007). Dieses Motif ist in einer Reihe von Proteinen konserviert und in der Lage, die in die Tumorentwicklung involvierten Kathepsine zu binden und zu hemmen (Meh *et al.* 2005). Eine Rolle von EpCAM als deren Substrat ist derzeit nicht bekannt (Schnell *et al.* 2013a).





#### Abbildung 1.7: Struktur des EpCAM Proteins.

Das Protein EpCAM, bestehend aus 314 Aminosäuren (AS), setzt sich aus drei verschiedenen Teilen zusammen. Die extrazelluläre Domäne mit Signalpeptid, einer EGF I- und Thyroglobulin-Domäne (242 AS) wird gefolgt von einer 23 AS langen Transmembrandomäne und einem kurzen (26 AS) intrazellulären, zytoplasmatischen Teil des Proteins.

2001 stellten Balzar *et al.* die Theorie auf, dass durch die Bildung eines EpCAM Tetramers adhäsive Komplexe geschaffen werden, die eine Anheftung an andere Zellen ermöglicht (Balzar *et al.* 2001). Während die TY-Domäne die laterale Verbindung des Tetramers vermittelt, ist die EGF-ähnliche Domäne (EGF I) für die Verbindung der Tetramere zweier Zellen, der sogenannten homophilen Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich (Balzar *et al.* 1999a, Balzar *et al.* 1999b, Balzar *et al.* 2001). Ein drittes Motif des extrazellulären Teils ist die Cystein-arme Region im Anschluss an die TY-Domäne. Dieses wird gefolgt von einer 23 AS langen, hydrophoben Transmembrandomäne, die in die Assoziation mit dem Tight Junction Protein

Claudin-7 einbezogen ist (Nubel *et al.* 2009). Das Protein ist beinhaltet zudem im Besitz eine kurze, zytoplasmatische Domäne, die an den Positionen 289-296 und 304-314 zwei Konsensussequenzen für die potentielle Bindung des Zytoskelettproteins  $\alpha$ -Actinin aufweist. Diese sind für die Lokalisation von EpCAM an den Zellkontakten und daher für die Adhäsionsfähigkeit des Proteins wichtig (Balzar *et al.* 1998).

Das Protein EpCAM besitzt in der extrazellulären Domäne drei N-Glykosylierungsstellen, die zu einem apparenten Molekulargewicht von 34, 40 oder 42 kDa führen können (Thampoe *et al.* 1988, Schon *et al.* 1993, Litvinov *et al.* 1994b). Die differentielle, posttranslationale Glykosylierung des Proteins findet an Asparagin in Position 74, 111 und 198 ( $N^{74}$ ,  $N^{111}$ ,  $N^{198}$ ) statt. Die Mutation an Position 198 hatte eine reduzierte Expression von EpCAM zur Folge, was auf eine stabilisierende Wirkung der  $N^{198}$ -Glykosylierung auf die Halbwertszeit des Moleküls an der Membran hinweist (Munz *et al.* 2008). Die Modifizierung aller drei Asparagine und ihre Hyperglykosylierung unterscheiden Karzinome des Hals-Kopf-Bereichs von gesundem Gewebe mit schwacher Glykosylierung (Pauli *et al.* 2003). Diese differenzielle Glykosylierung ist möglicherweise ein wichtiger Faktor für die Beeinflussung der unterschiedlichen Funktion von EpCAM in gesunden und malignen Geweben (Schnell *et al.* 2013a).

### 1.3.3 Funktion von EpCAM

Durch die Auslösung einer humoralen Immunantwort in Mäusen konnte EpCAM früh als Tumor-assoziiertes Antigen identifiziert werden (Herlyn *et al.* 1979) und als Zielstruktur in der Therapie von Karzinomen eingesetzt werden. Obwohl die Erschließung der vollen Funktion des Proteins bis heute andauert, wurde eine Rolle EpCAMs bei der homophilen Zell-Zell-Adhäsion beschrieben (Litvinov *et al.* 1994b, Balzar *et al.* 1998). Sowohl die extrazelluläre, wie auch die intrazelluläre Domäne des Proteins sind essentiell für diesen Prozess. So vermittelt der lange, extrazelluläre Teil die direkte Anheftung an EpCAM Moleküle, die auf benachbarten Zellen exprimiert sind (Balzar *et al.* 1998). Während die ektopische Expression von EpCAM in negativen Zellen zu einer Zellakkumulation und der Ausbildung von Zellkontakten führte, bewiesen Studien mit Deletionsmutanten die Bedeutung aller extrazellulären

Motive für die Adhäsion und die Lokalisation des Proteins an den Kontaktstellen der Zelle (Balzar *et al.* 2001). Die Behandlung der Zellen mit dem Aktin-Depolymerisationsagenz Zytocalasin D zeigte deutlich den zentralen Einfluss der intrazellulären Domäne auf die EpCAM-vermittelte Adhäsion (Balzar *et al.* 1998). Jedoch wurde angenommen, dass der Effekt von EpCAM auf die Zelladhäsion auch indirekter, modulierender Natur sein könnte. 1997 postulierten Litvinov *et al.* eine Zerstörung der Verknüpfung des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett in Folge einer gesteigerten EpCAM Expression. Dieser Vorgang resultierte in einer EpCAM-vermittelten, weitaus schwächeren Adhäsion der Zellen (Litvinov *et al.* 1997). Die EpCAM-abhängige Modulation der starken, Cadherin-vermittelten Adhäsion wird über einen Signalweg reguliert, in welchen die Phosphoinositol-3-Phosphat Kinase (PI3K) involviert ist (Winter *et al.* 2007). Durch die Schwächung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion erreicht EpCAM möglicherweise eine höhere Zellplastizität in epithelialen Geweben, was wiederum die Proliferation und Beweglichkeit der Zellen während der Morphogenese, der Entwicklung und der Entstehung von bösartigen Tumoren begünstigt (Schnell *et al.* 2013a). Zusätzlich zur Regulation der Zelladhäsion wurde kürzlich der Einfluss von EpCAM in Verbindung mit Claudin-7 auf die Zusammensetzung und Funktion der Tight Junctions und der damit einhergehenden Integrität des Epithels gezeigt (Lei *et al.* 2012, Wu *et al.* 2013). Zusammen mit CD44 und Tetraspaninen konnte beiden Proteinen außerdem auch ein positiver Effekt auf die Metastasierung von Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden (Kuhn *et al.* 2007). EpCAM ist weiterhin an der Komplexbildung mit Mitgliedern des „tetraspanin webs“, wie CD9, CD44, Metalloproteasen (e.g. ADAM 10) und heterodimeren G-Proteinen, beteiligt (Le Naour *et al.* 2006). Diese Koloalisation fördert neben Ereignissen wie der Induktion von Signalkaskaden auch die Migration, Adhäsion, Immunantwort und nicht zuletzt die Proliferation der Zellen (Hemler 2001, Yunta and Lazo 2003, Hemler 2005). Auswirkungen EpCAMs auf die Proliferation und eine direkte Rolle bei der Regulation des Zellzyklus konnten in diversen *in vivo* und *in vitro* Studien festgestellt werden. Dabei führte die exogene Expression von EpCAM oder Teilen des Moleküls zur Induktion, die Repression des Proteins zur Verminderung der Zellproliferation (Munz *et al.* 2004, Osta *et al.* 2004, Maetzel *et al.* 2009, Wenqi *et al.* 2009, Chaves-Perez *et al.* 2013). In einigen *in vitro*

Modellen führte die Induktion von EpCAM zu einem sehr schnellen Anstieg des onkogenen TF c-Myc, der Zellzyklusproteine Cyclin A und E und eFABP und einer damit verbundenen Proliferation (Munz *et al.* 2004, Munz *et al.* 2005, Maaser and Borlak 2008). Es konnte außerdem ein direkter Effekt von EpCAM auf die Transkription und Expression von Cyclin D1 beobachtet werden (Chaves-Perez *et al.* 2013). Des Weiteren erkannten Münz *et al.* mit Hilfe von EpCAM Mutanten, dass die intrazelluläre Domäne nicht nur notwendig, sondern ausreichend für die Regulation von c-Myc ist (Munz *et al.* 2004).

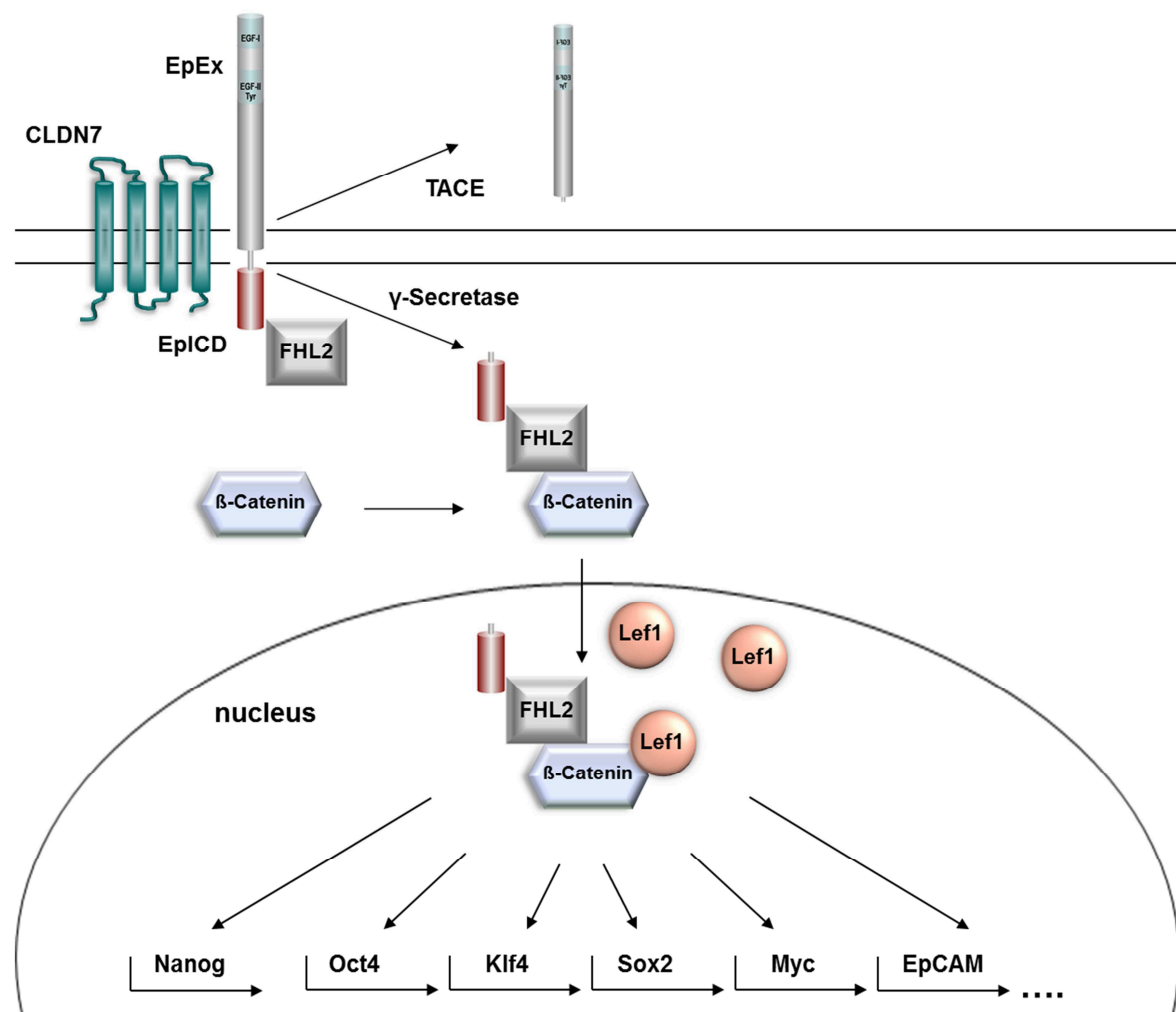
### **1.3.4 Spaltung von EpCAM**

#### **1.3.4.1 Spaltung und Signalfunktion des humanen EpCAM**

Ein aktuelles Modell des Signalweges humanen EpCAMs, das die Induktion des Prozesses durch eine sogenannte Regulierte Intramembranproteolyse (RIP) und die Fähigkeit der abgespaltenen zytoplasmatischen Domäne zur Aktivierung bestimmter Zielgene zeigt, wird anhand Abbildung 1.8 detailliert erklärt.

Als Initiatoren für die RIP konnten Denzel *et al.* 2009 zelluläre Interaktionen (juxtakrin) ermitteln (Denzel *et al.* 2009). Die Gruppe fand weiter, dass die bereits abgespaltene, lösliche Ektodomäne (parakrin) den Vorgang der Spaltung und die Signalkaskade noch verstärken konnte. Eine Spaltung EpCAMs in der extrazellulären Domäne und die damit verbundene Freisetzung der Ektodomäne (EpEX) ist die Grundvoraussetzung für die Generierung des intrazellulären Spaltprodukts (EpICD) durch einen Presenilin 2-beinhaltenden  $\gamma$ -Sekretase (PS) Komplex. Diese erfolgt durch die Metalloprotease TACE (Tumornekrosefaktor  $\alpha$  konvertierendes Enzym) und setzt die Ektodomäne, EpEX, als löslichen Liganden für intakte Moleküle und zur Induktion weiterer Spaltung frei. Wie auch die Spaltung und Freisetzung von EpICD ins Zytoplasma, konnte auch die extrazelluläre Prozessierung durch die Verwendung von spezifischen Proteaseinhibitoren bestätigt werden (Carpenter and Red Brewer 2009, Maetzel *et al.* 2009). Durch die Komplexbildung von EpICD mit drei zellulären Interaktionspartnern, ist es dem Spaltprodukt möglich vom Zytoplasma in den Nukleus zu translozieren, dort DNA zu binden und die Transkription verschiedener Gene wie beispielsweise *cmyc* zu regulieren (Maetzel *et al.* 2009, Munz *et al.* 2009).

Dabei stellt FHL2 (*four and a half LIM domain*) mit seinen viereinhalb LIM Domänen den zentralen Bindungspartner von EpCAM dar, der mit der zweiten und dritten LIM Domäne auch die beiden anderen Interaktionspartner  $\beta$ -Catenin und Lef-1 bindet (Martin *et al.* 2002, Labalette *et al.* 2004). FHL2, mit seiner vierten, für die Assoziation von EpCAM elementaren LIM Domäne, könnte als Gerüstprotein essentiell für die Initiation des EpCAM Signalosoms sein (Imrich *et al.* 2012).



**Abbildung 1.8: Spaltung und Signalkaskade des humanen EpCAM Moleküls.**

Basierend auf der Regulierten Intramembranproteolyse (RIP) wird EpCAM von TACE (extrazellulär) und einem  $\gamma$ -Sekretase-Komplex (intrazellulär) gespalten. Während der extrazelluläre, abgespaltene Teil des Moleküls (EpEX) als löslicher Ligand vorliegt, aktiviert das zytoplasmatische Spaltprodukt (EpiCD) nach der Komplexbildung mit FHL2,  $\beta$ -Catenin und Lef1 und der darauffolgenden Translokation in den Nukleus diverse Zielgene. Verändert nach Imrich *et al.* (Imrich *et al.* 2012).

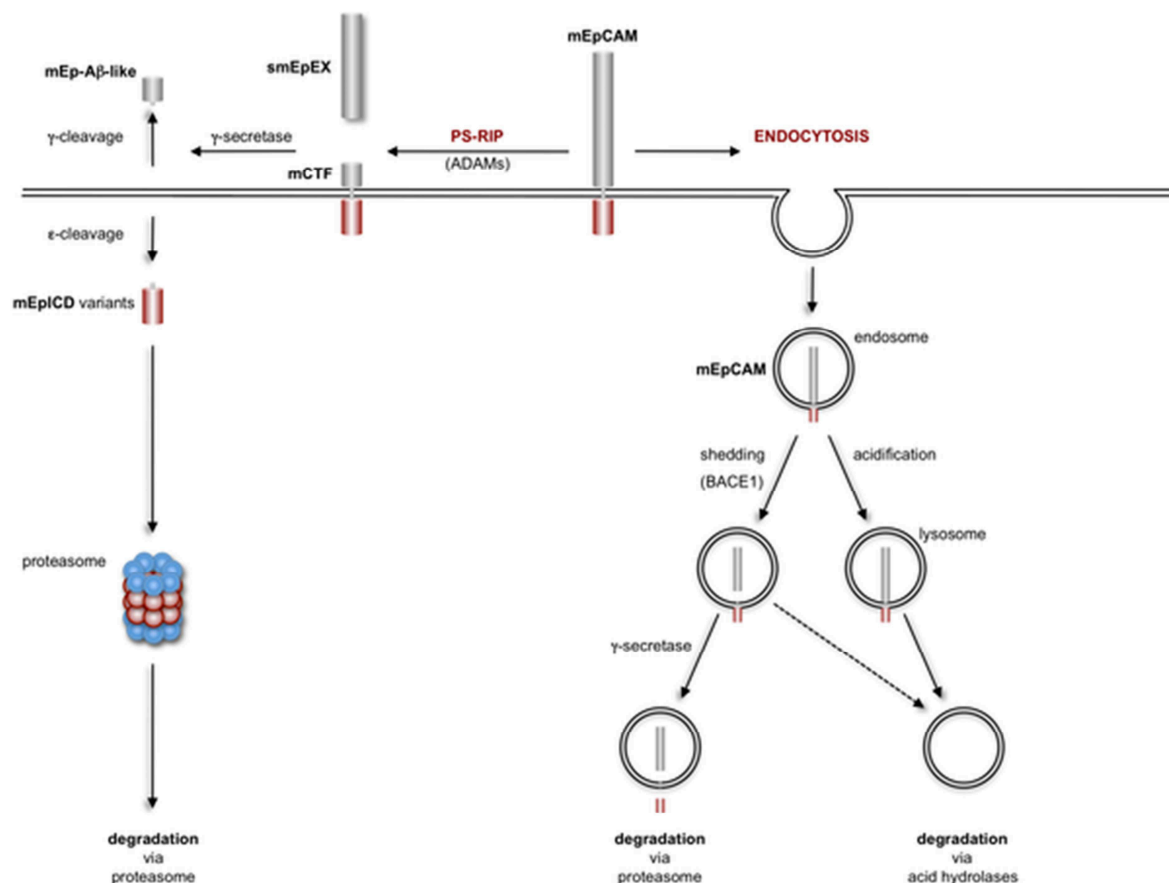
Die erhöhte Expression von EpCAM und die dadurch geschwächte, E-Cadherin-vermittelte Adhäsion haben einen Anstieg von nicht-membrangebundenem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma zur Folge (Litvinov *et al.* 1997, Winter *et al.* 2003a). Die Bindung des löslichen  $\beta$ -Catenins durch FHL2 und EpCAM verhindert möglicherweise die Degradierung des Proteins (Schnell *et al.* 2013a). Die differentielle Expression von TACE, Presenilinen und FHL2 in gesundem und malignem Gewebe und die damit einhergehenden Veränderungen der proteolytischen Prozessierung und Initiierung der Signalkaskade, können möglicherweise die unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften von EpCAM in Gesundheit und Krankheit erklären. So ist EpICD in gesunden Geweben ausschließlich an der Membran, in Karzinomen im Zellkern zu finden (Maetzel *et al.* 2009).

2013 wurde von Hachmeister *et al.* ein weiteres Enzym, die Aspartylprotease BACE-1 oder  $\beta$ -Sekretase, zur Spaltung von humanem und murinem EpCAM entdeckt (Hachmeister *et al.* 2013), das bereits in der neurodegenerativen Krankheit Alzheimer die Generierung des pathologischen A $\beta$ -Fragments vollzieht (Stockley and O'Neill 2008, Vassar *et al.* 2009, Willem *et al.* 2009).

#### **1.3.4.2 Spaltung und Abbau des murinen EpCAM**

Die proteolytische Prozessierung von murinem EpCAM verläuft, wie bereits für humanes EpCAM, aber auch viele andere Membranproteine beschrieben (Lal and Caplan 2011), nach der RIP und involviert dabei mehrere Metalloproteasen (ADAMs) (Hachmeister *et al.* 2013). Zusätzlich zu diesen wurde, wie oben erläutert, das Enzym, BACE-1 oder  $\beta$ -Sekretase, als eine neue Sheddase bei der EpCAM Spaltung identifiziert. Obwohl eine Expression der mRNA des Moleküls vornehmlich in Geweben des Gehirns, des Hypothalamus, des Rückenmarks und des Pankreas beschrieben wurde (Vassar *et al.* 1999), konnten Hachmeister *et al.* in allen verwendeten Zelllinien, insbesondere ES Zellen, hohe Transkriptmengen von BACE-1 messen (Hachmeister *et al.* 2013). Die ektopische Expression von BACE-1 führte zu einer vermehrten Proteolyse von murinem, aber auch humanem EpCAM, wobei die Intensität der Spaltung Zelllinien-abhängig war. Durch die Verwendung eines BACE-1 Inhibitors (C3) konnte weiterhin die Spezifität der Sheddase gezeigt werden. Zusammenfassend bedeutet dies die extrazelluläre Prozessierung des murinen

EpCAM Moleküls durch einerseits  $\alpha$ -Sekretasen (ADAMs), andererseits BACE-1 und die Generierung von löslichem murinem EpEX (smEpEX) und einem C-terminalen Fragment (CTF) in der Membran (siehe Abbildung 1.9). Obwohl die Gruppe belegen konnte, dass ADAMs und BACE-1 die hauptsächlichen Proteasen in der RIP des murinen EpCAM Moleküls sind, wurde die Beteiligung weiterer, noch nicht identifizierter Proteasen, diskutiert.



**Abbildung 1.9: Spaltung des murinen EpCAM Moleküls.**

Die Prozessierung des murinen EpCAM Moleküls führt zu einer Abspaltung des löslichen extrazellulären Teils (smEpEX). Als Substrat für die darauffolgende Spaltung der  $\gamma$ -Sekretasen fungiert das C-terminale Fragment (mCTF), aus dem sowohl das  $A\beta$ -ähnliche Fragment (mEp- $\beta$ ), wie auch fünf verschiedene EpICD Varianten generiert werden. Die verschiedenen EpICD Varianten werden proteosomal, endosomal (BACE-1) oder lysosomal (Hydrolasen) abgebaut.

Die intrazelluläre Spaltung von murinem EpCAM erfolgt durch  $\gamma$ -Sekretasen, die verschiedene EpICD Varianten und ein Fragment namens *mEp-A $\beta$ -like* generieren. Dieses Fragment ähnelt dem Spaltprodukt ( $A\beta$ ) des Proteins APP, das bei der

Alzheimer Erkrankung eine bedeutende Rolle spielt. Von den fünf unterschiedlichen EpICD Varianten war nur eine stabil genug, um ohne Vorbehandlung der Zellen massenspektrometrisch gemessen zu werden und stellt vermutlich das im Immunoblot detektierbare EpICD dar. Weitere vier Varianten von EpICD wurden mittels Massenspektrometrie und unter Verwendung geeigneter Inhibitoren identifiziert. Die *Membrane-assays* bei unterschiedlichen pH-Werten bei der Durchführung von Spaltungsversuchen und die Behandlung von Zellen mit Proteasominhibitoren wiesen den Abbau von murinem EpICD im Proteasom, aber auch die Notwendigkeit einer Prozessierung vom CTF zu EpICD bei der Spaltung von EpCAM auf. Der *membrane assay* macht die Trennung der Membran von Zytoplasma und Überstand und die Detektion von Spaltprodukten in jeder einzelnen Fraktion möglich. BACE-1 hat ein pH-Optimum der enzymatischen Aktivität bei pH 4,5, so dass davon ausgegangen wird, dass EpCAM endozytiert und mit Hilfe von BACE-1 in Endosomen und/ oder von sauren Hydrolasen in Lysosomen prozessiert wird (Hachmeister *et al.* 2013).

### **1.3.5 Expressionsmuster von EpCAM**

#### **1.3.5.1 EpCAM Expression in der Embryonalentwicklung und in gesundem Gewebe**

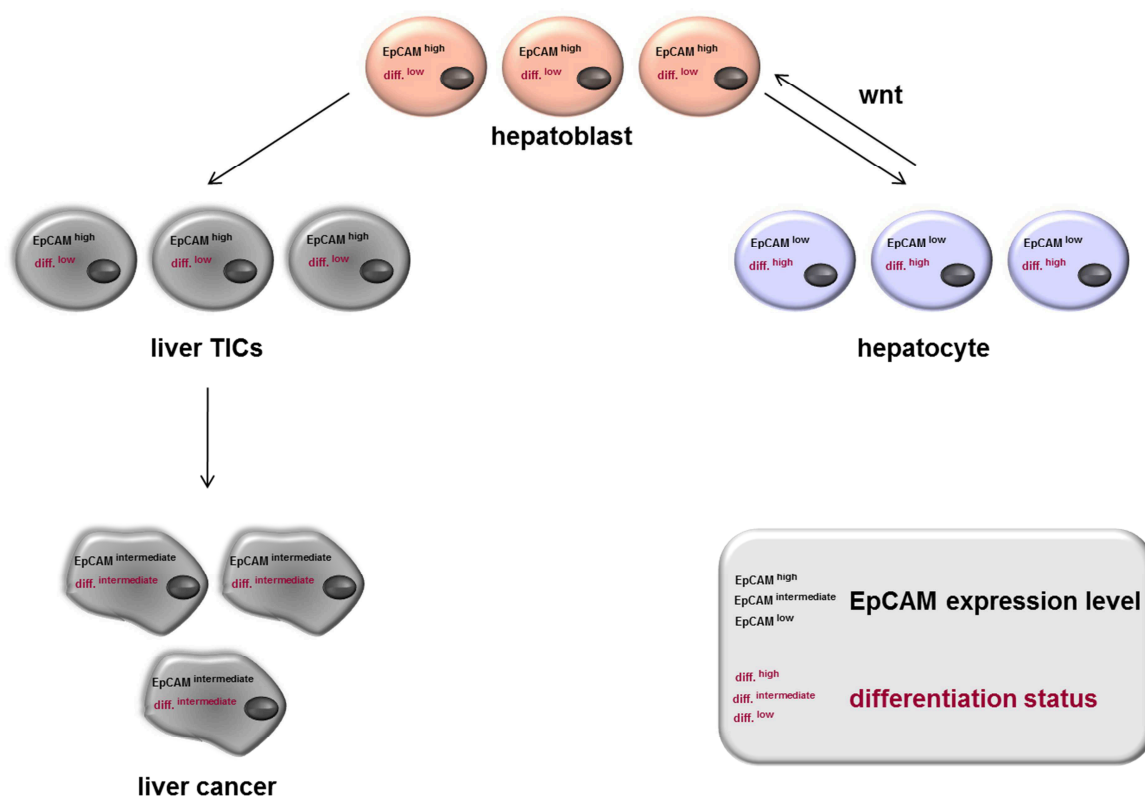
Trzpis *et al.* postulierten 2007, die Expression von EpCAM sei essentiell während der Embryonalentwicklung und Morphogenese (Trzpis *et al.* 2007b, Trzpis *et al.* 2008b). So kann das Protein bereits in Oozyten, im Zweizellstadium und in der Morula detektiert werden (Tarmann *et al.* 1990). Auch für embryonale Stammzellen aus der Maus (Gonzalez *et al.* 2009) und dem Menschen (Lu *et al.* 2010, Ng *et al.* 2010), die aus der Blastozyste isoliert wurden, konnte eine starke EpCAM Expression bestätigt werden. Im Laufe der Entwicklung aber wird eine differentielle, unterschiedlich starke Expression von EpCAM in verschiedenen fötalen Geweben, wie der Lunge, der Leber, den Nieren, dem Pankreas, den Milchdrüsen, der Haut, aber auch den Keimzellen, beobachtet (Kasper *et al.* 1995, Stingl *et al.* 2001, Dan *et al.* 2006). Während die frühen embryonalen Gewebe der Lunge, der Leber und des Pankreas eine starke EpCAM Expression aufweisen, zeigt das Lungenepithel im adulten



Organismus nur eine geringe, mature Leberzellen (Hepatoblasten) keine und der Pankreas eine hohe Expression des Proteins (Cirulli *et al.* 1995, Kasper *et al.* 1995, de Boer *et al.* 1999, Breuhahn *et al.* 2006, Schmelzer *et al.* 2007).

In gesundem Gewebe ist EpCAM basolateral in einfachen, unstratifizierten Epithelien wie dem Pseudoplatten- und dem Übergangsepithel, aber auch dem Drüsengewebe exprimiert. Nicht zu beobachten ist das Protein in mesenchymalen, Plattenepithel-, Muskel- oder Neuroendokringeweben (Moldenhauer *et al.* 1987, Momburg *et al.* 1987, Bumol *et al.* 1988, Litvinov *et al.* 1996). Nach Moldenhauer *et al.* rührt die Diversität der Expressionsstärke von unterschiedlichen Lokalisationen und Zelltypen her (Moldenhauer *et al.* 1987). So beschrieb die Gruppe beispielsweise die Expression im Magenepithel als gering, im Dünndarm als mittelmäßig und im Kolon als hoch. Auch Zellen der Haut weisen ausgeprägte Unterschiede in der EpCAM Expression auf. Während Keratinozyten und Melanozyten kein EpCAM exprimieren, ist eine Expression des Moleküls in der proliferativen Zone und den Schweißdrüsen deutlich erkennbar (Momburg *et al.* 1987, Tsubura *et al.* 1992). Abweichungen in der Expressionsstärke sind auch in den verschiedenen Organe des männlichen (Prostata, Testis) oder weiblichen (Ovarien, Zervix, Uterus) Genitaltrakts vorhanden (Tsubura *et al.* 1992, Litvinov *et al.* 1996). Organe mit einer starken Expression sind neben der Gallenblase, der respiratorische Trakt mit Tracheen, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen und die Drüsen des endokrinen Systems, genauer die Schilddrüse, die Hypophyse und die adrenale Drüse (Moldenhauer *et al.* 1987, Pauli *et al.* 2003). Des Weiteren zeichnen sich die proximalen und distalen Tubuli, das duktale Gewebe, die Nierengänge und die Inselzellen der Niere und das Pankreasgewebe durch eine positive EpCAM Expression aus (Momburg *et al.* 1987, Cirulli *et al.* 1998, Trzpis *et al.* 2007a). Bis auf die Gallengänge war die adulte, im Gegensatz zur fötalen, Leber größtenteils EpCAM negativ. Allerdings konnten Breuhahn *et al.* in Folge einer inflammatorischen Erkrankung einen Anstieg des EpCAM Levels in Zellen der Leber beobachten (Breuhahn *et al.* 2006). Die Gruppe postulierte weiter, dass die *de novo* Expression von EpCAM in maturen Hepatozyten mit einem regenerativen Potential verknüpft ist. Nach einer Schädigung des Organs wurde eine Repopulierung durch Differenzierung von regenerativen, EpCAM-positiven Vorläuferzellen festgestellt (de Boer *et al.* 1999). Dabei beschrieben Yoon *et*

*al.* eine Korrelation von Zunahme der EpCAM positiven Zellen mit dem Fortschreiten des Leberschadens (Yoon *et al.* 2011). Weiter postulierte und bestätigte die Gruppe, dass diese EpCAM exprimierenden Hepatozyten aus EpCAM positiven Vorläufer- oder Stammzellen generierte oder vielmehr differenzierte Hepatozyten sind.



#### Abbildung 1.10: EpCAM Expression in Zellen der Leber.

In Lebervorläuferzellen (Hepatoblasten), maturen Hepatozyten, Leber TICs und hepatozellulären Karzinomen korreliert eine hohe EpCAM Expression mit einem proliferativen Phänotyp und einem niedrigen Differenzierungsgrad.

Abbildung 1.10 stellt die Varianz der EpCAM Expression dem Differenzierungsgrad verschiedener Leberzellen gegenüber. Beginnend mit prä-hepatischen Vorläuferzellen oder Hepatoblasten, die durch einen geringen Differenzierungsstatus, eine hohe EpCAM Expression und ihre Funktion als regeneratives Reservoir charakterisiert sind, hat die Entwicklung zu maturen Hepatozyten den Verlust von EpCAM zur Folge (Tanaka *et al.* 2009). Auch hepatozelluläre TICs weisen vor ihrer Differenzierung zu Zellen von hepatozellulären Karzinomen eine hohe EpCAM Expression auf. Der Differenzierungsstatus der Leberzellen ist also negativ mit der

Expression des Proteins verknüpft. Es wurde eine potenzielle Rolle von EpCAM in der Regulation des Stammzell-Phänotyps von Lebervorläuferzellen diskutiert (Yoon *et al.* 2011, Gires 2012).

#### **1.3.5.2 EpCAM Expression in malignem und benignem Gewebe**

In den meisten malignen oder benignen Tumoren des Epithels ist entweder eine hohe *de novo* oder eine verstärkte EpCAM Expression zu verzeichnen (Zorzos *et al.* 1995, Litvinov *et al.* 1996). Sehr stark ist Expression des Markers dabei in Karzinomen des Dünndarms, des Kolons, der Lunge, der Brust und der Prostata (Litvinov *et al.* 1996, Spizzo *et al.* 2004, Went *et al.* 2004, Went *et al.* 2005, Spizzo *et al.* 2006, Went *et al.* 2006). Vor allem bei Brust-, Eierstock- aber auch Pankreas- oder Gallenblasenkrebs, ist sie mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden (Spizzo *et al.* 2002, Spizzo *et al.* 2004, Varga *et al.* 2004, Fong *et al.* 2008, Scheunemann *et al.* 2008). Einzig bei Karzinomen der Niere (Seligson *et al.* 2004), Subtypen von Lungenkarzinomen (Went *et al.* 2006) oder Schilddrüsenkarzinomen (Ralhan *et al.* 2010) konnte der gegenteilige Effekt, verbunden mit einer verbesserten Überlebenschance, beobachtet werden.

Untersuchungen hinsichtlich Metastasierung und der Expression in disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen (CTC) und sekundären Tumoren sind nicht schlüssig. Wiesen die meisten CTCs an den Membranen noch verstärkt EpCAM auf (Rao *et al.* 2005, Gorges *et al.* 2012), so war die starke EpCAM Expression nicht zwingend auch in den Zellen des Sekundärtumors, der Metastase, zu erkennen. Momburg *et al.* und später auch andere Arbeitsgruppen, konnten eine positive Korrelation zwischen CTCs und den entstandenen Tumoren herausfinden (Momburg *et al.* 1987, Chaubal *et al.* 1999, Kuhn *et al.* 2007), während weitere Publikationen und Studien eine reduzierte Expression von EpCAM in Sekundärtumoren beschrieben (Jojovic *et al.* 1998, Takes *et al.* 2001, Winter *et al.* 2003a, Winter *et al.* 2003b). Studien mit Ösophaguskarzinomzellen zeigten, dass sowohl Zellen mit keiner oder geringer, als auch Zellen mit hoher EpCAM Expression die Tumorentwicklung unterstützen und EpCAM positive Zellen den metastasierenden Vorgang der EMT (Epitheliale-Mesenchymale-Transition) nicht oder in geringem Maße durchlaufen (Driemel *et al.* 2013).

EpCAM wird nach wie vor als prognostischer und therapeutischer Marker definiert (Moldenhauer *et al.* 1987, Chaubal *et al.* 1999, Baeuerle and Gires 2007). Als therapeutisches Zielobjekt wurde das Protein bereits für einige Immuntherapien, wie die Behandlung von Patienten mit metastasierenden Kolon- oder Mamma-Karzinomen mit monoklonalen Antikörpern (Munz *et al.* 2010), oder zur Entwicklung von Tumor-spezifischen Antikörpern (Riesenberg *et al.* 2001) verwendet. Aber auch die Fusionierung von Toxinen (Di Paolo *et al.* 2003, Patriarca *et al.* 2012, Flatmark *et al.* 2013) und von TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Bremer *et al.* 2004a, Bremer *et al.* 2004b) an EpCAM-spezifische Antikörper Fragmente oder Impfungen (Mosolits *et al.* 2004) wurden als Therapieansatz vorangetrieben. Es wurden einige chimäre (chimärer Edrecolomab), humanisierte (3622W94), human-manipulierte (ING-1) und vollständig humane (Adecatumumab) EpCAM-spezifische, therapeutische Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten entwickelt (Imrich *et al.* 2012). Interessanterweise aber verursachten die Moleküle mit der höchsten Affinität (3622W94 und ING-1) schon bei niedrigen Konzentrationen eine akute Pankreatitis (LoBuglio *et al.* 1997, Goel *et al.* 2007). Im Moment werden noch einige EpCAM-spezifische, therapeutische Antikörper klinischen Studien unterzogen und seit 2009 ist ein EpCAM-trispezifischer Antikörper (Catumaxomab, Removab) für die Behandlung der Bauchwassersucht von Krebspatienten auf dem Markt (Baeuerle and Gires 2007, Munz *et al.* 2010).

## 1.4 Zielsetzung

Das Typ-I Transmembranprotein EpCAM vermittelt unter Ausbildung von Tetrameren eine homophile Zelladhäsion. Es wurde gezeigt, dass EpCAM eine große Rolle in der frühen Embryonalentwicklung spielt, so konnte das Protein bereits in der befruchteten Oozyte oder dem Zweizellstadium nachgewiesen werden. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden auch die aus der Blastozyste isolierten pluripotenten embryonalen Stammzellen als stark positiv beschrieben. Während das Expressionsmuster in gesundem, adulten Gewebe divers erscheint, ist eine deutliche Überexpression in epithelialen Tumorzellen und Tumor-initiierenden Zellen (TIC) zu sehen. Daher wird das Molekül als prognostischer, diagnostischer und therapeutischer Marker in der medizinischen Behandlung verwendet. Neben seiner Eigenschaft als Zelladhäsionsmolekül konnte unsere Gruppe in den letzten Jahren auch seine Spaltung, Signalfunktion und seine Rolle in der Regulation der Zellproliferation identifizieren. Durch eine regulierte Intramembranproteolyse (RIP) wird das Protein in einen löslichen extrazellulären (EpEX) und einen zytoplasmatischen (EplCD) Teil gespalten. Das intrazelluläre Spaltprodukt kann durch Komplexbildung mit FHL2,  $\beta$ -Catenin und Lef-1 in den Kern translozieren, DNA binden, so die Transkription von bestimmten Zielgenen (*cmyc*) und dadurch zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Proliferation regulieren. Vor kurzem konnten Analysen unserer Gruppe auch die Spaltung des murinen EpCAM Moleküls und den proteasomalen Abbau von EplCD beweisen.

Das große Differenzierungspotential, die hohe Expression von EpCAM und dessen Funktion in der Regeneration von Geweben (Leber, Niere) machen die Expression und Rolle von EpCAM in embryonalen Stammzellen zu einem interessanten Thema für die Grundlagen- aber auch regenerative Forschung. Daher waren die Ziele dieser Arbeit:

- Die molekulare und proteinbiochemische Charakterisierung von EpCAM, Pluripotenzmarkern, Zellzyklus- und Proliferationsgenen im Verlauf und der Differenzierung.
- Die molekulare Analyse eines potentiellen Einflusses von ektopisch exprimiertem EpCAM auf die Pluripotenz, den Zellzyklus und die Proliferation.

- Die immunhistochemische Charakterisierung der dreidimensionalen Zellstrukturen (*embryoid bodies*) und späten Embryonalstadien der Maus.
- Die Untersuchung eines möglichen Effekts von EpCAM auf die Entstehung von Zellen der verschiedenen Keimblätter unter Zuhilfenahme eines cDNA Expressionsarrays.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien und Kits

**Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien**

Artikel	Hersteller
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck KGaA, Darmstadt
Antikörperverdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG, Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Kalifornien (USA)
Aqua dest.	Braun, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Brij L23 Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg
Corning® Costar® Stripette	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Cryomold Intermediate 4566 (15x15x5mm)	Sakura Finetek, Staufien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
EGTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eosinlösung 0,5%	Apotheke Klinikum Großhadern
ESGRO® LIF	Millipore, Schwalbach
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg

Artikel	Hersteller
FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Gelatine	Serva GmbH, Heidelberg
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Hartmann, Heidenheim
Handschuhe Peha-Soft Latex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Hematoxylin Gill`s Formula H- 3401	Merck KGaA, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Mayer`s Hämalun Lösung	Roche, Mannheim
MNase S7	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
NP-40	Metabion, International AG, Planegg
Oligonukleotide	Merck, KGaA, Darmstadt
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Apotheke Klinikum Großhadern, Großhadern
PBS Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetboy® Comfort	Roche, Mannheim
Probes Mastermix	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Proteinase K	GE Healthcare, Freiburg
Protein G Sepharose™ 4FastFlow	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Propidiumiodid	Roche, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail Complete	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Puromyzin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Stempan E14 GMEM	Roche, Mannheim
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Sakura Finetek, Staufen
TissueTek® O.C.T Compound	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Biochrom AG, Berlin



Artikel	Hersteller
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/ EDTA	Serva GmbH, Heidelberg
Tween	Linaris, Bettingen am Main
Vectamount®	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	

**Tabelle 2.2: Verwendete Kits**

Artikel	Hersteller
Amata™ Mouse ES Cell Nucleofector™ Kit	Lonza Ltd, Basel
NucleoSpin Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Hersteller
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance™ 3	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger „Super Frost“	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	American National Can, Menasha (USA)
Safe Seal Tips Professional	Starlab, Hamburg
	Biozym Scientific GmbH, Hessisch
Reagenzreservoir	Oldendorf
Skalpelle	Costar, New York (USA)
Spritzen	Feather/ PFM, Köln
Sterilfilter	Braun, Melsungen

Artikel	Hersteller
Zellkulturflaschen und -schalen	Millipore, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 15ml/ 50ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugengefäße 2ml/ 1,5ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5ml (Nuklease-frei)	Eppendorf AG, Hamburg
96-well Zellkulturplatten flach	Costar, New York (USA)
96-well Zellkulturplatten <i>ultra-low attachment</i>	Nunc, Wiesbaden Corning Incorporated Costar, Amsterdam

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 2.4: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Gel und Western Blot Dokumentation	BioRad, Kalifornien (USA)
Branson Sonifier W-250 D	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Durchflusszytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipette „Transferpette“	Brand GmbH, Wertheim
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren	Schott AG, Jena
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kryostat Modell CM 1900	Leica, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Microplate Reader „MRX“	Dynatech Laboratories, Bad Nauheim
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Gerät	Hersteller
Spektrophotometer „GeneQuantPro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/ Sieg
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektionssystem „Nucleofector“	Amara, Köln
Vortex Mixer	IKA Works Inc., Wilmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 46 R	Sorvall, Bad Homburg

## 2.2 Antikörper

**Tabelle 2.5: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Spezies	Hersteller
α-alpha CAA	Maus IgG1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α-EpCAM	Ratte IgG2a,k	Becton Dickinson, Heidelberg
α-EpCAM	Meerschweinchen	PSL GmbH, Heidelberg
α-Flag	Maus IgG1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α-H3K4me3	Kaninchen IgG	Millipore, Bedford (USA)
α-H3K27me3	Kaninchen IgG	Millipore, Bedford (USA)
α-Ki67	Ratte IgG2a	eBioscience, Frankfurt
α-Pol II	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α-SSEA1	Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α-Vimentin	Kaninchen IgG1	Abcam, Cambridge (USA)

**Tabelle 2.6: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Hersteller
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Kaninchen-α-Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Pferd-α-Maus IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Ziege-α-Kaninchen IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

Antikörper	Hersteller
FITC Ziege- $\alpha$ -Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fluorescein Kaninchen- $\alpha$ -Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Isotyp Kontrolle $\alpha$ -Ratte IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PO Kaninchen- $\alpha$ -Meerschweinchen IgG	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
PO Kaninchen- $\alpha$ -Ziege IgG	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
PO Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG (H&L)	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)
POX Ziege- $\alpha$ Maus Ig	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

## 2.3 Oligonukleotide und Plasmide

### 2.3.1 Primer

Tabelle 2.7: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
<b>qPCR</b>	
BW_Gusb	GGGTGTAGTAGTCAGTCACAGAC
FW_Gusb	CAACCTCTGGTGGCCTTACC
BW_EpCAM	CTAGGCATTAAGCTCTCTGTGGATCTCACC
FW_EpCAM	CAGTGTACTTCCTATGGTACACAGAATACT
BW_Oct3/4	GTTCTCATTGTTGTCTGGCTTCC
FW_Oct3/4	ATCGGACCAGGCTCAGAGGTATTG
BW_p53	CGGAACATCTCGAAGCGTTTA
FW_p53	CTCTCCCCCGCAAAAGAAAAA
BW_Ki67	GCTCGCCTTGATGGTTCCT
FW_Ki67	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT
BW_Flag	CCTGCATGGAGAACTCGGGTGC
FW_Flag	AAGGAGACTACAAGGATGACG
BW_Afp	ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG

Primer	Sequenz (5' → 3')
FW_Afp	CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC
BW_Wt1	GGGTCCTCGTGTTTGAAGGAA
FW_Wt1	GAGAGCCAGCCTACCATCC
BW_Gal	CTGTTCAAGGTCCAACCTCT
FW_Gal	GGCAGCGTTATCCTGCTAGG
BW_Gata4	CCGAGCAGGAATTTGAAGAGG
FW_Gata4	GCCTGTATGTAATGCCTGCG
BW_Col1a1	CCACGTCTCACCATTGGGG
FW_Col1a1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT
BW_Pax6	CTGGTGGGCAGCATGCACGA
FW_Pax6	CGGAGTGAATCAGCTTGGTGG
BW_Nes	GGTGGGGGTTCTGGCCTTAA
FW_Nes	GGAGAGTCGCTTAGAGGTGC
BW_Foxa2	AGTTCTGCCAGCGCTGCTGG
FW_Foxa2	GGAAGGGCACGAGCCATCCG
BW_Cyclin D1	TCATCTTAGAGGCCACGAACAT
FW_Cyclin D1	CAGAAGTGCGAAGAGGAGGTC
<b>ChIP</b>	
BW_EpCAM 1	ACGTGAAAGCCGAAAGGGAT
FW_EpCAM 1	CGCAGCGCAAAGTCAAGTAT
BW_EpCAM 2	GGACGAGACTGGACGTGAAA
FW_EpCAM 2	ATTGAAAGTAAGCTGCCAGG
BW_Oct3/4	GCCTAGTTCCTGGGTGGAGAA
FW_Oct3/4	CCCTTTGAACCTGAAGTCAGATATTT
BW_alpha CAA	TCCTAATCCACTGCAATAAGC
FW_alpha CAA	ACCAGCCTACATCCCATTATAGAAA
BW_Cenpl	CACAGAGCCAGGATACTGCTT
FW_Cenpl	AACTCACGGATATTGAAGTGCAT

Alle Sequenzen der aufgelisteten Primer wurden der „Harvard PrimerBank“ entnommen. Hergestellt wurden die Primer von der Firma Metabion International AD (Planegg).

### 2.3.2 Plasmide

**Tabelle 2.8: Verwendete Plasmide**

Plasmide	Kurzbeschreibung	Referenz
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromylinresistenz	Prof. Bornkamm
141pCAG::YFP	YFP in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister
141pCAG::EpICD-YFP	EpICD- YFP in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister
141pCAG::EpCAM-YFP	EpCAM, YFP getagt, in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister
141pCAG::EpCAM-TF	EpCAM, Tev-Flag getagt, in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister

## 2.4 cDNA Array „RealTime ready Custom“

Der Array wurde von der Firma Roche in einem 96-well Format für diese Arbeit entworfen. Dabei wurde für jedes Gen eine spezifische Taqman-Sonde hergestellt, validiert und in je eine Vertiefung der Multiwellplatte eingebracht.

Für die Quantifizierung der amplifizierten Produkte kann dabei das Förster Resonanzenergietransfer-Prinzip , kurz FRET, ausgenutzt werden, da die Sonden jeweils an einem Ende mit dem Reporter-Farbstoff FAM, an dem anderen Ende mit einem Quencher markiert wurden. Durch die Anregung mit einer Lichtquelle gibt der Reporter einen Teil der Energie an den Quencher ab. Wird während der Synthese des Gegenstranges die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut, entfernen sich Reporter und Quencher voneinander. Dadurch kann in der Folge ein zunehmendes Fluoreszenzsignal gemessen werden.

**Tabelle 2.9: Liste aller Gene des "RealTime ready Custom"-Arrays**

Position	Symbol	Beschreibung (englisch)
A01	Afp	Alpha fetoprotein

Position	Symbol	Beschreibung (englisch)
A02	Brix1	BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (S. cerevisiae)
A03	Cd34	CD34 antigen
A04	Cd9	CD9 antigen
A05	Cdh5	Cadherin 5
A06	Cdx2	Caudal type homeobox 2
A07	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1
A08	Commd3	COMM domain containing 3
A09	Crabp2	Cellular retinoic acid binding protein II
A10	Ddx4	DEAD (Asp-GLU-ALA-Asp) box polypeptide 4
A11	Des	Desmin
A12	Diap2	Diaphanous homolog 2 (Drosophila)
B01	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B
B02	Ednrb	Endothelin receptor type B
B03	Eomes	Eomesodermin homolog (Xenopus laevis)
B04	Fgf4	Fibroblast growth factor 4
B05	Fgf5	Fibroblast growth factor 5
B06	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
B07	Fn1	Fibronectin 1
B08	Foxa2	Forkhead box A2
B09	Foxd3	Forkhead box D3
B10	Gabrb3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3
B11	Gata4	GATA binding protein 4
B12	Gata6	GATA binding protein 6
C01	Gbx2	Gastrulation brain homeobox 3
C02	Gcg	Glucagon
C03	Gcm1	Glial cells missing homolog 1 (Drosophila)
C04	Gdf3	Growth differentiation factor 3
C05	Grb7	Growth factor receptor bound protein 7
C06	Hba-x	Hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex
C07	Hbb-y	Hemoglobin Y, beta-like embryonic chain

Position	Symbol	Beschreibung (englisch)
C08	Hck	Hemopoietic cell kinase
C09	Iapp	Islet amyloid polypeptide
C10	Iftm1	Interferon induced transmembrane protein 1
C11	Iftm2	Interferon induced transmembrane protein 2
C12	Igf2bp2	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein
D01	Il6st	Interleukin 6 signal transducer
D02	Ins2	Insulin II
D03	Kit	Kit oncogene
D04	Krt1	Keratin 1
D05	Lama1	Laminin, alpha 1
D06	Lamb1	Laminin B1
D07	Lamc1	Laminin, gamma 1
D08	Lefty1	Left right determination factor 1
D09	Lefty2	Left right determination factor 2
D10	Lifr	Leukemia inhibitory factor receptor
D11	Lin28	Lin28-homolog A (C. elegans)
D12	Myf5	Myogenic factor 5
E01	Myod1	Myogenic differentiation 1
E02	Nanog	Nanog homeobox
E03	Nes	Nestin
E04	Neurod1	Neurogenic differentiation 1
E05	Nodal1	Nodal
E06	Nog	Noggin
E07	Nr5a2	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
E08	Nr6a1	Nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1
E09	Numb	Numb gene homolog (Drosophila)
E10	Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
E11	Pax4	Paired box gene 4
E12	Pax6	Paired box gene 6
F01	Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1



Position	Symbol	Beschreibung (englisch)
F02	Pecam	Platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1
F03	Podxl	Podocalyxin-like
F04	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1
F05	Pten	Phosphatase and tensing homolog
F06	Ptf1a	Pancreas specific transcription factor 1a
F07	Rest	RE1-silencing transcription factor
F08	Runx2	Runt related transcription factor 2
F09	Sema3a	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
F10	Serpina1a	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1a
F11	Sfrp2	Secreted frizzled-related protein 2
F12	Sox17	SRY-box containing gene 17
G01	Sox2	SRY-box containing gene 2
G02	Sst	Somatostatin
G03	Sycp3	Synaptonemal complex protein 3
G04	Tat	Tyrosine aminotransferase
G05	Tcfcp2l1	Transcription factor CP2-like 1
G06	Tdgf1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
G07	Tert	Telomerase reverse transcriptase
G08	Utf1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
G09	Wt1	Wilms tumor 1 homolog
G10	Zfp42	Zinc finger protein 42
G11	Actb	Actin, beta
G12	GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase
H01	Gal	Galanin
H02	T	Brachyury
H03	Myog	Myogenin
H04	Nkx 2.5	NK2 homeobox 5
H05	Gusb	Glucuronidase
H06	HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoryl transferase

Position	Symbol	Beschreibung (englisch)
H07	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H08		RT + Control – 5` region
H09		RT + Control – center region
H10		RT + Control – 3` region
H11		RT – Control
H12		RT – Control

## 2.5 Zelllinien

**Tabelle 2.10: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Bemerkungen
E14TG2 $\alpha$	Wildtyp-Zelllinie
E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-3SIP
E14TG2 $\alpha$ -YFP*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::YFP
E14TG2 $\alpha$ -EpICD-YFP*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::EpICD-YFP
E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-YFP*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::EpCAM-YFP
E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::EpCAM-TF

Die Wildtyp-Zelllinie E14TG2 $\alpha$  wurde aus einer Mausblastocyste isoliert und freundlicherweise von Dr. Markus Conrad zur Verfügung gestellt. Alle anderen Zelllinien wurden von Matthias Hachmeister (mit \* gekennzeichnet) etabliert.

## 2.6 Mausembryos

Die CBL Wildtyp-Mausembryos der Entwicklungsstadien E9.5, E12.5 und E18.5 wurden in Kollaboration von Dr. Matthias Kieslinger isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Entwicklungsstufen wurden anhand des Vaginalpfropfes berechnet, der einen halben Tag nach der Verpaarung an den gedeckten weiblichen Tieren zu erkennen ist. Deshalb handelt es sich bei den

genannten Stadien um Embryos, die neun, 12 oder 18 Tage nach der Verpaarung isoliert wurden.

## 2.7 Puffer und Stammlösungen

Alle für die Kultivierung von Bakterien oder für Arbeiten mit Nukleinsäuren verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden sofort nach ihrer Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert und wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### 2.7.1 Kultivierung von ES Zellen

Stempan E14 GMEM:	FKS; L-Glutamin; 2,75g/l $\text{NaHCO}_3$ ; 60000 U/ml ESGRO® LIF
PBS:	8,0g NaCl; 0,2g KCl; 1,15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in 1l $\text{H}_2\text{O}$
Einfriermedium:	Stempan E14 GMEM; 10% DMSO

### 2.7.2 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer:	PBS mit 5% FKS (Maniatis <i>et al.</i> 1982)
Propidiumiodid (PI)-Färbelösung:	PBS mit 5% FKS; 1µg/ml Propidiumiodid (PI)

### 2.7.3 Chromatin-Immunopräzipitation

Lysispuffer:	10mM Tris-HCl pH7,5; 10mM NaCl; 3mM $\text{MgCl}_2$ ; 0,5% NP-40
MNase-haltiger-Reaktionspuffer:	10mM Tris-HCl pH7,5; 10mM NaCl; 3mM $\text{MgCl}_2$ ; 1mM $\text{CaCl}_2$ ; 4% NP-40, 1x Proteinase Inhibitor; 25U MNase
Immunopräzipitation (IP)-Verdünnungspuffer:	20mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM EDTA pH 8,0; 1% Triton-X100; 150mM NaCl; 1x Proteinase Inhibitor

---

Elutionspuffer:	25mM Tris-HCl pH7,5; 10mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS
Waschpuffer I:	20mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM EDTA pH8,0; 1% Triton-X100; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 1x Proteinase Inhibitor
Waschpuffer II:	20mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM EDTA pH8,0; 1% Triton-X100; 500mM NaCl; 0,1% SDS; 1x Proteinase Inhibitor
Waschpuffer III:	10mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM EDTA pH8; 250mM LiCl; 1% NP-40; 1% Natriumdeoxycholat; 1x Proteinase Inhibitor
TE-Puffer:	10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0

## **3 METHODEN**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Zellkulturbedingungen**

Das Passagieren muriner embryonaler Stammzellen E14TG2 $\alpha$  und alle weiteren Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank vorgenommen. Des Weiteren wurden ausschließlich sterile Stripetten, Spitzen sowie Lösungen verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und bei 95% Luftfeuchtigkeit.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zellen wurden mittels Trypsin-Behandlung geerntet und bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 300g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1ml kaltem Einfriermedium gelöst, in Kryogefäße überführt und erst bei -80°C langsam eingefroren, bevor sie bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Nach dem raschen Auftauen der Zellen bei 37°C wurde das DMSO im Einfriermedium durch die Zugabe des fünffachen Volumens von Kulturmedium verdünnt. Das durch Zentrifugation (300g, 5 min) erhaltene Zellpellet wurde dann in frischem Medium aufgenommen. Nach 24 Stunden wurden die toten Zellen durch Erneuerung des Mediums entfernt.

#### **3.1.3 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen**

Besonders wichtig für die Kultivierung der murinen embryonalen Stammzellen E14TG2 $\alpha$  war es zum einen die Zellkulturflaschen für eine gute Adhärenz mit Gelatine zu beschichten, zum anderen das Medium wie in 2.7.1 beschrieben mit LIF

(*leukemia inhibitory factor*) zu versetzen, um die Pluripotenz der Zellen weiterhin zu erhalten (Smith *et al.* 1988).

Bei einer 80-prozentigen Konfluenz der Zellen wurden sie erst mit Phosphat-Puffer (PBS) gewaschen, um sie dann in einer 0,5-prozentigen Trypsinlösung für ca. fünf Minuten bei 37°C zu inkubieren, bis sie sich selbstständig von der Zellkulturoberfläche lösen. Nach Abstoppen der Reaktion des Enzyms Trypsin mit FKS-haltigem Medium wurden die Zellen zentrifugiert (300g, 5 min), anschließend in einem entsprechenden Volumen des Zellkulturmediums resuspendiert und in neue Gelatine-beschichtete Zellkulturflächen ausgesät. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach jeweils 48 Stunden Inkubation bei 37°C.

#### **3.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin geerntet. Ein Teil der Einzelzellsuspension wurde dann mit Trypanblau in einem 1:1 Verhältnis gemischt und unter Verwendung der Fuchs-Rosenthal-Kammer unter einem Mikroskop gezählt. Das Trypanblau ermöglichte es, tote Zellen von lebenden zu differenzieren.

Die Berechnung der exakten Zellzahl erfolgte nach Angaben des Herstellers der Zählkammer.

#### **3.1.5 *in vitro* Differenzierung durch Generierung von *embryoid bodies* (EBs)**

Ebenfalls zur Differenzierung der Zellen E14TG2 $\alpha$  verwendet wurde die sogenannte *hanging drop*-Methode, die an Wang *et al.* (Wang and Yang 2008) angelehnt ist.

Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann durch eine Behandlung mit Trypsin geerntet und mit Differenzierungsmedium in Einzelzellsuspension gebracht. Anschließend wurde unter Verwendung von Trypanblau und der Fuchs-Rosenthal-Kammer die Gesamtzellzahl bestimmt (siehe 3.1.4). Die Zellsuspension wurde zu einer Endkonzentration von 500 oder für immunhistochemische Versuche von 1000 Zellen pro 20 $\mu$ l verdünnt.

Nach dem Bestücken des Bodens einer Zellkulturschale (Durchmesser 20cm) mit 20ml PBS, wurde die Zellsuspension unter Verwendung einer Multikanalpipette in

Tropfen mit einem Volumen von 20µl auf den Deckel derselben Zellkulturschale aufgebracht. Dann wurde der Deckel vorsichtig gedreht und auf den Boden der Schale platziert. Nach 72 Stunden bei 37°C wurden *ultra-low attachment*-Multiwellplatten mit frischem Differenzierungsmedium versehen, die Tropfen aus den Schalen transferiert und erneut für mindestens 96 Stunden inkubiert. Abhängig von der weiteren Vorgehensweise wurden die *embryoid bodies* (EBs) für eine bestimmte Zeitspanne entweder weiter in den bereits verwendeten Platten gelassen oder in Gelatine-beschichtete Multiwellplatten übertragen.

### **3.1.6 Transfektion der Stammzellen durch Nukleofektion**

Die Zellen wurden, wie bereits in 3.2.4 beschrieben, geerntet und gezählt. Für jeden Nukleofektionsansatz wurden  $2 \times 10^6$  Zellen zentrifugiert (300g, 5 min), das Pellet in 100µl Amaxa Nukleofektionsreagenz gelöst und zu der Plasmid DNA in eine spezielle Nukleofektionsküvette gegeben. Unter Zuhilfenahme des Nukleofector® Gerätes wurden die Zellen im Programm A-24 und nach Angaben des Herstellers transfiziert.

### **3.1.7 Untersuchung der Oberflächenexpression von Proteinen mittels Durchflusszytometrie**

Um die Expression bestimmter Proteine an der Oberfläche zu bestimmen wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie angewendet. Hierfür wurden Primärantikörper, die den extrazellulären Anteil eines Proteins binden, in Kombination mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-konjugierten Sekundärantikörpern verwendet. Alle Antikörper wurden in einer 1: 50 Verdünnung eingesetzt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin behandelt und in Zellkulturmedium geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet nochmals gewaschen, um dann in FACS-Puffer gelöst und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper behandelt zu werden. Die Zellen, die als Kontrolle für die Spezifität des Sekundärantikörpers dienen sollten, wurden parallel, aber ohne den ersten Antikörper in FACS-Puffer inkubiert. Ehe die Zellen dann mit dem Sekundärantikörper für 15 Minuten gefärbt wurden, wurden sie zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500µl FACS-

Puffer resuspendiert. Weiterhin wurden zu dieser Zellsuspension 0,5mg/ml Propidiumiodid (PI) gegeben, um bei der folgenden Analyse zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden zu können.

Die Auswertung und der Vergleich aller Proben untereinander, erfolgten mit Hilfe des „CellQuest™“ Programmes, das neben Fluoreszenz auch die Analyse der Granularität und Größe der Zellen erlaubt. Um alle Proben miteinander vergleichen zu können, wurde bei der Berechnung der Expression mittels der Kontrollfärbungen normiert. Dabei wurden die PI-positiven Zellen vernachlässigt.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektrophotometer „GeneQuantPro“ im jeweiligen Programm mit Quarz-Küvetten bestimmt.

### **3.2.2 Isolation von RNA und Synthese von cDNA**

Die Isolation der RNA aus murinen embryonalen Stammzellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in einem entsprechenden Puffer mit QiaShredder-Säulen aufgeschlossen.

Die Reverse Transkription der RNA zu komplementärer DNA (cDNA) wurde mit dem Kit „QuantiTect Reverse Transcription“, wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt. Um eine Degradierung der RNA zu vermeiden, wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers alle Pipettierschritte auf Eis unternommen.

Mit dem zweistufigen Protokoll wurde standardmäßig 1µg Gesamt-RNA umgeschrieben.

Nach dem Verdau eventueller Reste genomischer DNA im ersten Schritt, wurde die behandelte RNA im zweiten Schritt zu cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde durch die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C beendet.



Ein geringes Volumen der RNA aus dem ersten Schritt wurde in der folgenden quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet, um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA ausschließen zu können.

### 3.2.3 Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die exakte Analyse der Genexpression mittels Real Time quantitativer PCR (qPCR) wurde der Plattencycler LightCycler® 480 und der Doppelstrang-spezifische Mastermix „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“ der Firma Roche verwendet. Als Matrize diente die in Abschnitt 3.2.2 hergestellte cDNA der jeweils zu untersuchenden Zellen.

**Tabelle 3.1: qPCR Reaktionsansatz**

Volumen	Reagenz
5µl	SYBR Green I Master
1µl	cDNA
1µl	Primer sense
1µl	Primer antisense
2µl	H <sub>2</sub> O
Σ 10µl	

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Protokoll sind in Tabelle 3.5 und 3.6 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: qPCR Protokoll**

Temperatur	Zeit	Ramp rate (°C/s)	Zyklen	Detektions-Modus	Reaktion
95°C	10 min	4,4	1	--	Vorinkubation
95°C	10 sec	4,4	45	--	Amplifikation
65°C	10 sec	2,2		--	
72°C	15 sec	4,4		"Single"	
95°C	5 sec	4,4	1	--	Schmelzkurve
65°C	1 min	2,2		--	
97°C		0,11		kontinuierlich	

Temperatur	Zeit	Ramp rate (°C/s)	Zyklen	Detektions-Modus	Reaktion
40°C	30 sec		1	--	Kühlen

### 3.2.4 Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines cDNA Arrays

Zur Untersuchung der Expression bestimmter Gene, die für die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen eine Rolle spielen, wurde ein „RealTime ready Custom“-qPCR Array von der Firma Roche hergestellt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Namen aller Gene sind in Tabelle 2.9, das qPCR Protokoll ist in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Die Normierung der  $c_T$ -Werte (englisch für „cycle threshold“) aller Gene wurde mithilfe des  $c_T$ -Werts des Referenzgens Glucoronidase (Gusb) vorgenommen. Der  $c_T$ -Wert ist eine theoretische Größe, die den Anfang der exponentiellen Phase einer PCR-Reaktion angibt.

**Tabelle 3.3: qPCR Protokoll "RealTime ready Custom"-Array**

Temperatur	Zeit	Ramp rate (°C/s)	Zyklen	Detektions-Modus	Reaktion
95°C	10 min	4,4	1	--	Vorinkubation
95°C	10 sec	4,4	50	--	Amplifikation
60°C	30 sec	2,2		--	
72°C	1 sec	4,4		"Single"	
40°C	30 sec	2,2	1	--	Kühlen

### 3.2.5 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation wurde sowohl an pluripotenten, wie auch an differenzierten E14TG2 $\alpha$  durchgeführt. Dabei muss betont werden, dass die differenzierten Zellen durch die Sphäroid-ähnliche Struktur für die Formaldehydbehandlung schwerer zugänglich waren. Deshalb wurden differenzierte Zellen vorher bestmöglich durch eine zusätzliche Verwendung von Trypsin vereinzelt.

Nachdem die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und erneut in 20 ml frischem Kulturmedium aufgenommen wurden, folgte die Zugabe von 540µl Formaldehyd (37%) und die Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Addition von Glycin zu einer Endkonzentration von 125mM. Nach fünf Minuten auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (500g, 4°C, 5 min) und zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Die Isolation der Nuklei wurde durch das Waschen des Pellets in eiskaltem Lysispuffer herbeigeführt. Die Inkubation mit 25U MNase wurde mit EGTA in einer Endkonzentration von 3mM gestoppt. Nach Zugabe von 10% SDS und 5M NaCl wurde der rohe Kernextrakt in einem Brunzen Sonifier auf Eis behandelt. Dabei wurden folgende Parameter eingestellt: Amplitude 35%, Puls fünf Sekunden, Pause 25 Sekunden, Gesamtdauer des Pulses sechs Minuten.

Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 16000g und 4°C für zehn Minuten konnte die Chromatin Lösung als Überstand abgenommen und aliquotiert werden. Dabei wurde ein bekanntes Volumen als Inputkontrolle bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Immunopräzipitation erfolgte mit geeigneten Antikörpern und Protein G Sepharose Kügelchen. Zuallererst wurde hierfür die Chromatin Lösung mit dem IP Verdünnungspuffer versetzt und mit 5µg Antikörper über Nacht bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Parallel dazu wurden die Sepharose Kügelchen zweimal mit PBS gewaschen und ebenfalls in IP Verdünnungspuffer rotiert. Nach Zentrifugation der Kügelchen (2000g, 2 min) wurden diese nun zusammen mit der Chromatin-Antikörper-Lösung ein weiteres Mal über Nacht bei 4°C auf dem Rotor gedreht. Ehe die spezifisch gebundenen Chromatinfragmente von den Kügelchen eluiert wurden, erfolgten mehrere Waschschrte, die in Tabelle 3.8 aufgelistet sind. Die Elution wurde in 200µl des vorgewärmten Elutionspuffers unter Schütteln im Thermomixer (65°C, 900rpm, 15 min) vorgenommen. Nach Zentrifugation der Proben (2000g, 2 min) wurde dieser Schritt mit halbem Volumen unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und mit Proteinase K über Nacht bei 65°C behandelt.

**Tabelle 3.4: Waschschritte ChIP**

Schritt	Puffer	Volumen (ml)	Zeit (min)
1	Wasch I	1	5
2	Wasch I	1,5	5
3	Wasch II	1,5	5
4	Wasch III	1,5	5
5	TE	1	1
6	TE	1	1

Im Folgenden wurde die DNA, wie auch die Inputkontrolle, mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean up“-Kit von Macherey-Nagel auf gereinigt. Hierbei wurde das SDS nach Angaben des Herstellers mit einem speziellen Puffer entfernt.

In der anschließenden qPCR mit den in Abschnitt 2.3.1 gelisteten Primern wurde die Menge an präzipitierter DNA gemessen. Die Inputkontrolle diente dabei als Vergleich.

### 3.3 Immunhistochemie

Die wie in Abschnitt 3.1.5 generierten *embryoid bodies* (EBs), aber auch Mausembryos und Zellpellets wurden in Kryomolds platziert, mit dem Einbettmedium „TissueTek“ blasenfrei überschichtet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Unter Zuhilfenahme des Gefriermikrotoms wurden dann 4µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Super Frost Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet wurden, bevor sie bis zur weiteren Verwendung erneut bei -20°C aufbewahrt wurden.

Nach dem Auftauen und Fixieren der Präparate wurden sie fünf Minuten in PBS rehydriert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch Inkubation der Schnitte in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate für 25 Minuten mit Normalserum überschichtet (1:20-1:200 in PBS), um einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers entgegenzuwirken. Das Normalserum wurde aus dem Blut des Tieres gewonnen, in welchem auch der Sekundärantikörper produziert wurde.

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur in einer speziell für jeden Antikörper ausgetesteten Verdünnung (1:50-1:1000). Die Negativkontrolle wurde ausschließlich mit PBS behandelt. Es wurden dann entweder ein Fluorochrom-konjugierter Zweitantikörper (für 1-2 Stunden) oder ein biotinylierter Brückenantikörper (für 1 Stunde) verwendet. Davor und danach wurden die Objektträger jeweils erst mit reinem PBS, dann mit einer 50-prozentigen Brij-Lösung (in PBS) gewaschen. Handelte es sich bei dem zweiten Antikörper um die biotinylierte Brücke, wurde anschließend der Avidin-Biotin-PO-Komplex auf die Präparate gegeben und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Substrat für die Reaktion wurde das Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol eingesetzt. Die Kerne wurden mit Mayer`s Hämalaun Lösung angefärbt.

Abschließend wurden die angefärbten Schnitte mit Kaisers Glycingelatine eingedeckelt.

## 4 ERGEBNISSE

Wie von Balzar *et al.* bereits 1999 beschrieben, wird EpCAM in allen einfachen Epithelien des menschlichen, adulten Gewebes baso-lateral, wenn auch in unterschiedlicher Stärke exprimiert (Balzar *et al.* 1999b). Während sich beispielsweise im normalen Magenepithel nur eine geringe Menge an EpCAM in der Membran befindet, ist das Epithel im Darm, verglichen mit dem aller anderer Gewebe, wohl das mit der höchsten Expression. Auch Karzinome verschiedener Lokalisationen weisen eine überaus hohe EpCAM Expression auf (Baeuerle and Gires 2007, Trzpis *et al.* 2007a). Die Plastizität der EpCAM Expression aber wird am Beispiel der Leber deutlich: Stamm- oder Vorläuferzellen exprimieren EpCAM sehr stark, jedoch kommt es bei der Differenzierung der regenerativen Leberzellen zu reifen Hepatozyten zu einem Verlust der EpCAM Expression (de Boer *et al.* 1999). Betrachtet man ferner eine maligne Transformation von Leberzellen zu hepatozellulären Karzinomen, so fällt auf, dass Tumor-initiierende Zellen (TICs) in diesen Karzinomen eine sehr hohe, der restliche Tumor aber eine intermediäre EpCAM Expression aufweist (Yamashita *et al.* 2008). In diesen Fällen ist der Differenzierungsstatus der Zellen negativ mit der EpCAM Expression korreliert (Imrich *et al.* 2012).

Des Weiteren ist die Präsenz des Proteins in der Embryogenese, genauer in den Keimzellen, von Säugern von Bedeutung (Anderson *et al.* 1999).

Das Expressionsmuster und den Effekt von EpCAM auf die Erhaltung des pluripotenten Phänotyps embryonaler Stammzellen und die konnten Gonzalez *et al.* zeigen (Gonzalez *et al.* 2009). Obgleich die Expression von EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen in pluripotentem Zustand sehr hoch ist, wird EpCAM in Folge einer Differenzierung in zweidimensionalen Kulturen sowohl an der Membran, wie auch auf Gesamtproteinebene drastisch reduziert. Dies geht mit einer Änderung der Zellmorphologie, sowie einem Rückgang einiger Stammzell-spezifischer Marker, wie zum Beispiel Oct3/4 oder Stat3, einher.

Aufbauend auf die bereits publizierten Ergebnissen eben genannter Studien, wurde in der vorliegenden Arbeit die Differenzierung in dreidimensionalen Strukturen, sogenannten *embryoid bodies* (kurz: EBs) im Hinblick auf die EpCAM Expression untersucht. Diese Mini-Organstrukturen erlaubten einen längeren Differenzierungszeitraum und somit eine stärkere Differenzierung der Zellen. Außerdem ähneln sie durch ihre Dreidimensionalität in ihrem Aufbau einem Embryo in den ersten Stufen der Embryogenese.

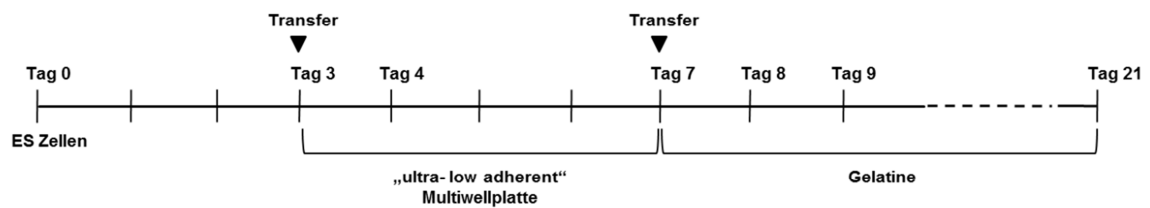
## **4.1 *In vitro* Differenzierung von E14TG2 $\alpha$ und deren Auswirkungen auf EpCAM und andere Marker**

### **4.1.1 Die Generierung und Morphologie von *embryoid bodies***

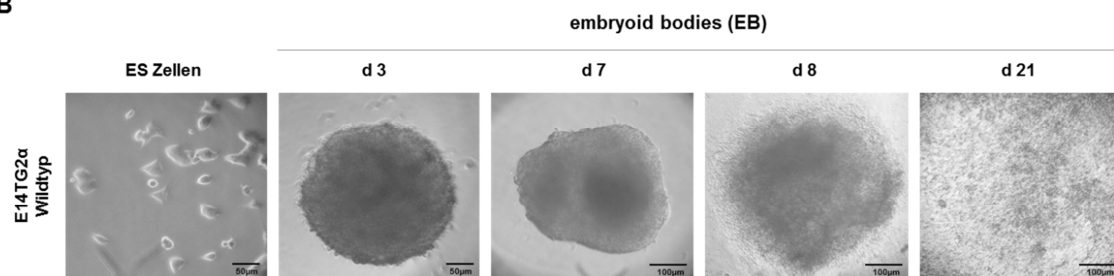
Um murine embryonale Stammzellen (ES Zellen) E14TG2 $\alpha$  in einer dreidimensionalen Kultur zu differenzieren, wurde die *hanging drop*-Methode nach Wang *et al.* (Wang and Yang 2008) hinsichtlich der eigenen Versuche modifiziert und angewendet. Die Verwendung dieser Methode, im Gegensatz zu einer Differenzierung in Suspensionskultur erlaubt es, *embryoid bodies* (EBs) aus einer definierten Zellzahl zu generieren. Die Verwendung einer Suspensionskultur sieht das Schütteln einer homogenen Zelllösung bis zur Akkumulation zu Sphäroid-ähnlichen Strukturen vor. Abbildung 4.1 (A) zeigt den genauen Ablauf dieser Methode: Eine Einzelzellsuspension bestehend aus  $2,5 \cdot 10^3$  Zellen/ml in Differenzierungsmedium wird hergestellt, diese wird in 20 $\mu$ l Tropfen auf den Deckel einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 20cm aufgetragen und für drei Tage im Inkubator behalten. Am Tag drei (im Diagramm mit einem Pfeil markiert) werden die in den hängenden Tropfen gebildeten EBs in *ultra-low attachment*-Multiwellplatten mit einer speziellen Beschichtung übertragen, die keine Adhäsion an den Boden der Vertiefungen zulässt. Wie die erste Klammer in der Abbildung darstellt, wurden die EBs anschließend für weitere vier Tage in eben genannten Platten bei 37°C inkubiert. Ob und für wie lange die Sphäroid-ähnlichen Strukturen im Anschluss in Gelatine-beschichteten Platten inkubiert wurden, hing vom jeweiligen Versuch ab und wird in den kommenden Abschnitten einzeln beschrieben. EBs beispielsweise, die für immunhistochemische

Untersuchungen eingefroren und im Kryotom geschnitten wurden, wurden nach den ersten sieben Tagen der Differenzierung weiterhin in den speziell beschichteten Platten behalten. Bei Versuchen mit längeren Differenzierungszeiträumen wurde nach Bedarf das Medium gewechselt.

**A**



**B**



**Abbildung 4.1: Generierung von *embryoid bodies*.**

Pluripotente E14TG2 $\alpha$  ES Zellen wurden geerntet, in Einzelzellsuspension gebracht und wie in 3.1.5 beschrieben mittels der *hanging drop*-Methode kultiviert. **(A)** Nach drei Tagen Inkubation der Zellen in einem 20 $\mu$ l Tropfen wurden die Sphäroid-ähnlichen Strukturen für weitere vier Tage in *ultra-low attachment*-Multiwellplatten überführt. An Tag sieben erfolgte ein Transfer der EBs auf Gelatine-beschichtete Platten, in welchen sie bis zum jeweiligen Versuchsende inkubiert wurden. **(B)** Wildtyp-Zellen wurden an den verschiedenen Tagen mit Hilfe eines Mikroskops fotografiert. Während das erste Bild die Morphologie der verwendeten Ausgangszellen zeigt, sind auf den beiden folgenden nicht-adhären EBs zu sehen. An Tag acht (d8) und 21 (d21) befanden sich die Zellen bereits auf Gelatine. Dargestellt sind repräsentative Bilder der jeweiligen Kulturbedingungen der EBs.

Repräsentative EBs verschiedener Stadien des Differenzierungsprozesses sind in Abbildung 4.1 **(B)** dargestellt. Beginnend mit den pluripotenten Zellen sind von links nach rechts nicht-adhären EBs der Tage drei (d3), sieben (d7) und der Tage acht und 21 (d8, d21) auf Gelatine zu erkennen. Die runden Kolonien der undifferenzierten embryonalen Stammzellen (kurz ES Zellen) sind dichtgepackt, dreidimensional gewachsen, voneinander abgegrenzt und ohne erkennbare Fortsätze. Diese Charakteristika weisen auf einen pluripotenten Status der Zellen hin, der es gestattete



die Zellen für weitere Versuche zu verwenden. Der Kontrast des ersten EB (d3) zum Hintergrund weist auf eine starke Verdichtung der Zellen hin, während der EB des siebten Tages heller und somit weniger kompakt erscheint. Aufgrund der Proliferation änderte sich außerdem die Größe und Form der dreidimensionalen Strukturen. Da die Bilder mit unterschiedlicher Vergrößerung aufgenommen wurden, ist dies dem dritten Bild allerdings nicht zu entnehmen. Nach Transfer der EBs auf Gelatine war eine Adhäsion eines Teils oder der kompletten Strukturen zu verzeichnen. In Abbildung 4.1 (**B**) ist an Tag acht (d8) zwar noch die Form des ursprünglichen EBs zu erahnen, jedoch hat sich die Sphäroid-ähnliche Struktur bereits vollständig aufgelöst, wobei alle Zellen fest adhäriert sind. Nach 21 Tagen Inkubation und Differenzierung haben die Zellen einen Rasen-ähnlichen Zellhaufen gebildet, der einen Großteil der Oberfläche der Vertiefung einnimmt.

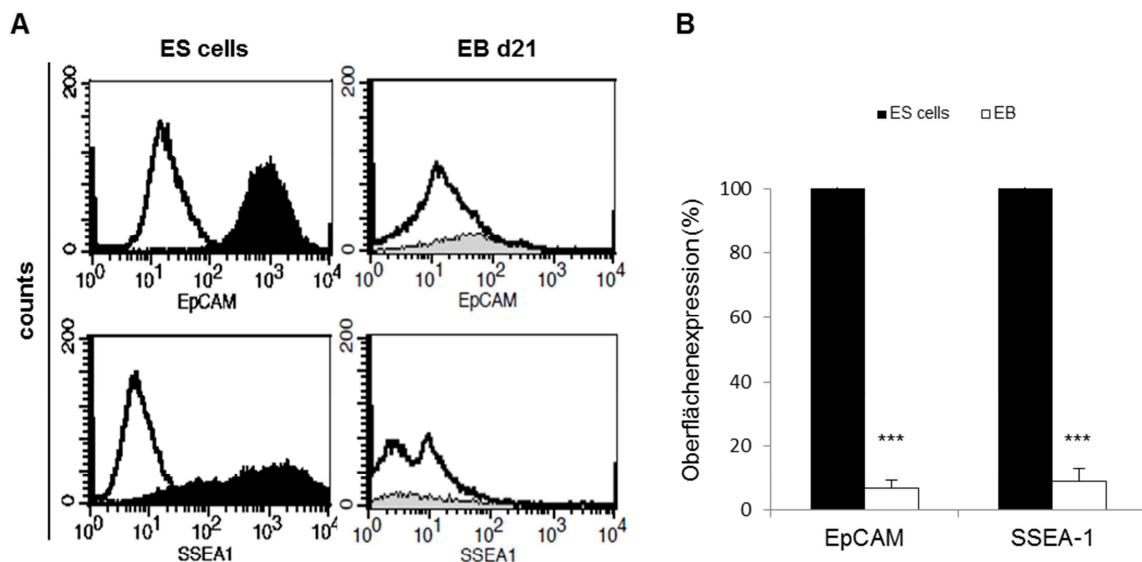
#### **4.1.2 Die Differenzierung von ES Zellen führt zu Änderungen der EpCAM Expression**

Die morphologische Untersuchung der EBs im vorangegangenen Abschnitt 4.1.1 konnte eine Veränderung der Struktur bezüglich der Form und Dichte zeigen, nicht aber die Differenzierung bestätigen. Dies sollte im weiteren Verlauf anhand eines etablierten Pluripotenzmarkers an der Zelloberfläche, SSEA-1 (Solter and Knowles 1978, Williams *et al.* 1988), verifiziert werden. Des Weiteren wurde die EpCAM Expression untersucht. Dazu wurden die Zellen der jeweiligen Stadien geerntet, gewaschen und die Proteine EpCAM und SSEA-1 gemäß Abschnitt 2.7.2 mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Fluorescein-markierten Sekundärantikörper ermöglichten anschließend eine Detektion im Durchflusszytometer. Mit Hilfe der „CellQuest™“-Software wurden Histogramme angefertigt, die eine Analyse und einen Vergleich der Menge an gemessenem Oberflächenprotein erlaubten. Die Kontrollfärbungen, im Diagramm dargestellt als offene Kurven, wurden in Abwesenheit des jeweiligen Primärantikörpers durchgeführt.

Die Abbildung 4.2 (**A**) zeigt vier solcher Histogramme, die Ergebnisse einer repräsentativen Messung der Membranproteine EpCAM (obere Reihe) und SSEA-1 (untere Reihe) zum einen in pluripotenten Zellen (schwarze Kurven), zum anderen in Zellen nach 21 Tagen Differenzierung (hellgraue Kurven) enthalten. Der Vergleich der

Kurven von undifferenzierten und differenzierten Zellen lässt eine drastische Reduktion beider Proteine an der Membran erkennen. Teil (B) der Abbildung 4.2 fasst drei unabhängige, gemittelte Messungen zusammen. Im Säulendiagramm ist wie erwartet eine Abnahme des Pluripotenzmarkers SSEA-1 von 91,1 Prozent abzulesen. Die Expression von EpCAM dagegen sinkt sogar auf einen Wert von 7,7 ( $\pm 2,14$ ) Prozent.

Die ermittelten Werte der differenzierten in (B) im Vergleich zu denjenigen der pluripotenten Zellen sind nach den Kriterien, die in genannte werden, als hochsignifikant zu bewerten.

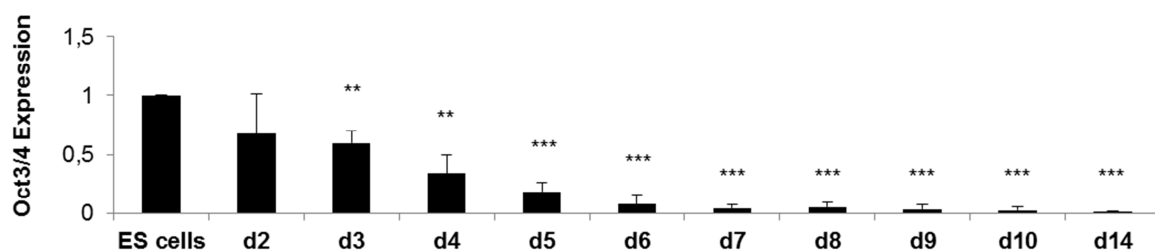


**Abbildung 4.2: Abnahme von EpCAM und SSEA-1 an der Oberfläche von E14TG2 $\alpha$  ES Zellen nach 21-tägiger Differenzierung in *embryoid bodies*.**

Mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.1.7) und unter Verwendung EpCAM- und SSEA-1-spezifischer Antikörper wurde die Expression von EpCAM an der Oberfläche von pluripotenten (schwarz) und differenzierten (grau/weiß) Zellen bestimmt. Dazu wurden EBs generiert (siehe 3.1.5) und für 21 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Die Expression von SSEA-1 sinkt in differenzierten Zellen auf 8,9 ( $\pm 4,01$ ) Prozent, während EpCAM an der Membran um 92,3 Prozent reduziert wird. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (B). Repräsentativ dargestellt sind in (A) die Histogramme eines einzelnen Versuchs.

Die Reduktion von SSEA-1 auf Proteinebene bestätigte einen differenzierten Zustand der Zellen nach 21 Tagen. Jedoch konnte weiterhin keine Aussage darüber getroffen

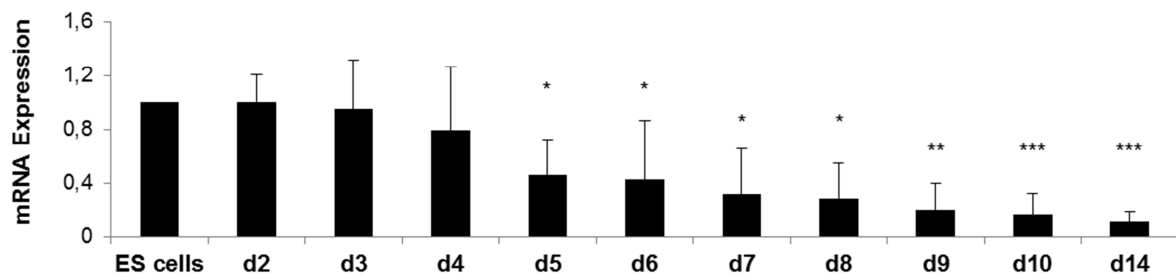
werden, wann genau der Differenzierungsprozess einsetzte. Deshalb wurde eine Zeitreihe, angefangen mit pluripotenten Zellen bis hin zu EBs nach 14tägiger Differenzierung, in Bezug auf die Transkription ausgewählter Zielgene analysiert. Dazu wurde aus den Zellen der einzelnen Zeitpunkte RNA isoliert und in cDNA transkribiert (siehe Abschnitt 3.2.2). Für die Untersuchung mittels RealTime quantitativer PCR (siehe 3.2.3) auf Transkript-Ebene wurde ein weiterer, bereits 1990 und 1998 (Okamoto *et al.* 1990, Nichols *et al.* 1998) beschriebener, Pluripotenzenmarker, Oct3/4, verwendet.



**Abbildung 4.3: Reduktion des Pluripotenzenmarkers Oct3/4 auf transkriptioneller Ebene.**

Nach dem Ernten der Zellen am jeweiligen Tag der Differenzierung wurde die RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und die Expression mit Hilfe von qPCR quantifiziert. Die Menge des Transkripts von Oct3/4 nahm sofort nach Initiation der Differenzierung ab und fiel auf einen Wert von 0,0077 ( $\pm 0,0054$ ). Es handelt sich um die Ergebnisse dreier eigenständiger Versuche, deren Durchschnitt und Standardabweichung berechnet wurden. Die Signifikanzen aller Werte sind auf den Wert der pluripotenten Stammzellen (ES cells) bezogen.

Die Auswertung der Oct3/4 Expression innerhalb der Zeitreihe ergab eine rasche Reduktion des Transkripts. Bereits an Tag 2 und 3 (d2, d3) war eine um mehr als 30 beziehungsweise 40 Prozent geringere Menge an mRNA vorhanden. Ab dem fünften Tag (d5) ging die transkriptionelle Expression des Markers konstant zurück, bis an Tag 14 (d14) ein Wert von 0,0077 ( $\pm 0,0054$ ) erreicht wurde. Die gemittelten Ergebnisse aller drei Messungen sind als unterschiedlich signifikant einzustufen, wobei diese mit Zunahme des Differenzierungsgrades anstieg.



**Abbildung 4.4: Reduktion von EpCAM auf transkriptioneller Ebene durch Differenzierung von E14TG2α ES Zellen.**

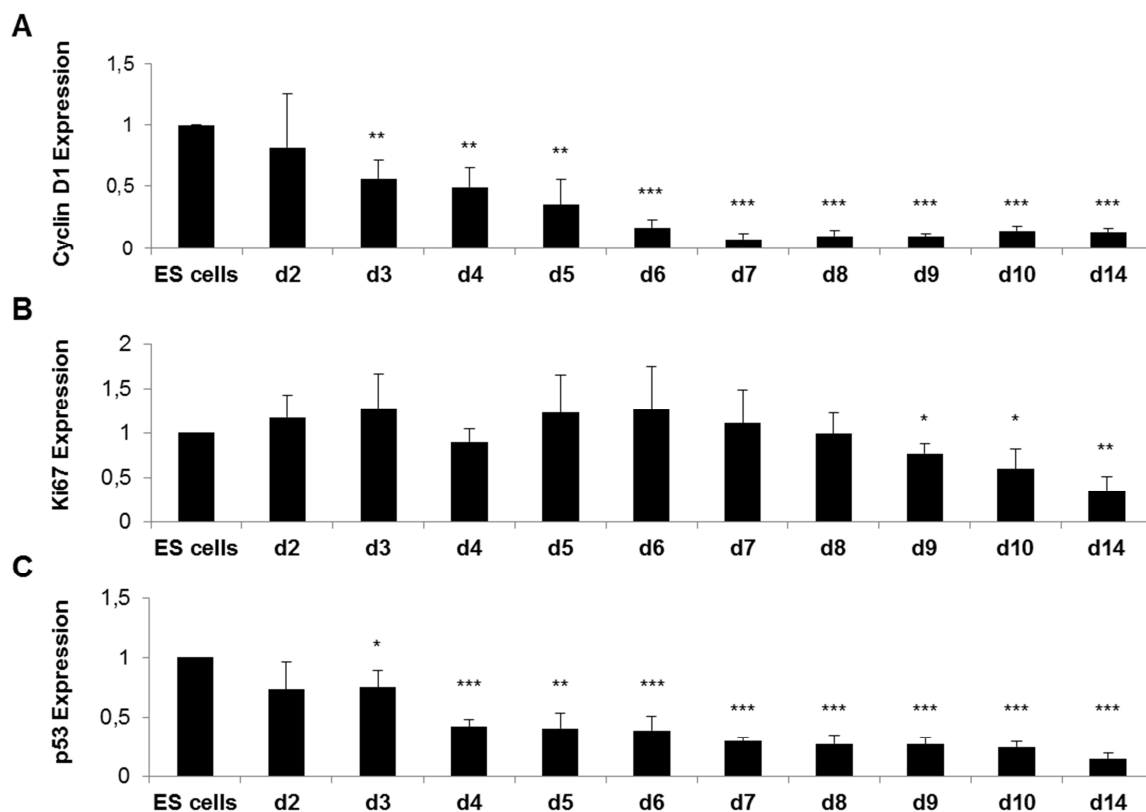
Zellen der einzelnen Differenzierungsschritte wurden geerntet, gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die RNA isoliert, cDNA daraus synthetisiert und mittels qPCR die Menge an Produkt quantitativ bestimmt (siehe auch 3.2.2 und 3.2.3). Obgleich die Menge an EpCAM auf mRNA Ebene zu Beginn stabil bleibt, kommt es zu einer stetigen Reduktion im Verlauf der Differenzierung, bis hin zu einem Wert von 0,11 ( $\pm 0,08$ ) an Tag 14 (d14). Die in drei unterschiedlichen Experimenten gemessenen Werte wurden gemittelt und mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Die Signifikanzen aller Werte sind auf den Wert der pluripotenten Stammzellen (ES cells) bezogen.

cDNAs derselben Zeitreihe wurden eingesetzt, um die Regulation der EpCAM Expression auf transkriptioneller Ebene zu klären. Drei separate Messungen wurden berechnet, gemittelt und sind mit Standardabweichungen und Signifikanzen in Abbildung 4.4 dargestellt. Anders als die Reduktion des Pluripotenzmarkers Oct3/4 setzte eine deutlich sichtbare Regulation der EpCAM mRNA, um etwa 50 Prozent, erst an Tag 5 (d5) ein. Weiterhin wurde dieses Niveau nur langsam und weniger stark gesenkt. Die Expression der *Epcam* mRNA betrug in den Zellen der 14 Tage inkubierten EBs (d14) nur 11 ( $\pm 7,8$ ) Prozent verglichen mit der Expression der ursprünglichen, undifferenzierten Zellen.

#### 4.1.3 Auswirkungen der Differenzierung auf Zellzyklus- und Proliferationsmarker

In Kapitel 4.1.1 wurde die Generierung und Morphologie von EBs analysiert. Dabei zeigte sich eine Größenzunahme dieser Strukturen. Ferner bestätigte die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Oct3/4 eine Differenzierung der Zellen, die mit einer Reduktion von EpCAM auf mRNA Ebene (gezeigt in Abschnitt 4.1.2) verbunden war. Ein Differenzierungsprozess geht meist mit dem Verlust der

Proliferation einher und es war bereits bekannt, dass EpCAM einen Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus hat (Munz *et al.* 2004, Maaser and Borlak 2008, Chaves-Perez *et al.* 2013). Aus diesen Gründen wurde die transkriptionelle Expression von einem Proliferations-, Ki67, und zwei Zellzyklusmarkern, Cyclin D1 und p53, überprüft (siehe Abbildung 4.5). Dazu wurden die bereits für die Oct3/4 und EpCAM Untersuchung verwendeten cDNAs mit speziellen Primern in der quantitativen PCR vermessen.



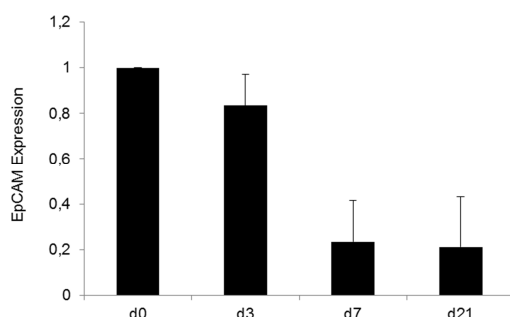
**Abbildung 4.5: Einfluss von Differenzierung auf die Transkription der Cyclin D1, Ki67 und p53 Gene.**

E14TG2α ES Zellen wurden, wie in 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, geerntet, aus der RNA wurde cDNA hergestellt und mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion vermessen. Dabei wurde eine Reduktion für die Transkripte von Cyclin D1 (**A**) und p53 (**C**) verzeichnet, während die Expression der mRNA von Ki67 erst zu- und wieder abnimmt (**B**). Dargestellt sind die gemittelten Werte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen aller Werte sind auf den Wert der pluripotenten Stammzellen (ES cells) bezogen.

Verglichen mit der Expression in pluripotenten Zellen war bei der Expression der mRNA von Ki67 bis Tag drei (d3) ein Anstieg zu erkennen (siehe **B**). Einen Tag nach dem Transfer der Zellen in speziell beschichtete Multiwellplatten (d4) aber sank die Expression auf einen Wert unter eins, ehe sie wieder anstieg. Allerdings nahm die Menge der Transkripte ab dem siebten Tag der Differenzierung weiterhin bis zu einem gemittelten Wert von  $0,35 (\pm 0,16)$  ab. Das Expressionsmuster von Cyclin D1, abgebildet in (**A**), dagegen war dem von Oct3/4 (siehe Abbildung 4.3) sehr ähnlich. Die bereits in den ersten beiden Tagen (d2, d3) zu erkennende reduzierte Expression gelangte gegen Ende des Versuchs auf einen Wert von  $0,13 (\pm 0,02)$ . Auch die Expression von p53 in (**C**) wurde bis Tag vier halbiert ( $0,41 \pm 0,06$ ). Im Gegensatz zu den anderen Markern allerdings blieb die Expression dann aber bis Tag zehn (d10) relativ stabil.

#### 4.1.4 Epigenetische Histonmodifikationen und verändertes Bindungsverhalten von Polymerase II

Die Ergebnisse des Abschnitts 4.1.2 zeigten zwar eine verminderte Expression sowohl des Pluripotenzmarkers Oct3/4, wie auch des in dieser Arbeit untersuchten Markers EpCAM. Es konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, wie diese beiden Gene reguliert wurden. Mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation, kurz ChIP, ist eine Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit DNA, in unserem Fall von methyliertem Histon 3 oder der Polymerase II (Pol II) mit den Promotoren von *Epcam* und *Oct3/4*, möglich.



**Abbildung 4.6: EpCAM Expression auf mRNA Ebene zur Kontrolle der Chromatin Immunopräzipitationsergebnisse.**

Zellen wurden zur Differenzierung ausplattiert, an den entsprechenden Tagen geerntet, gewaschen und bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die isolierte RNA zu cDNA umgeschrieben und die Menge der Transkripte quantitativ unter Zuhilfenahme der qPCR gemessen. EpCAM wurde auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert. Dargestellt sind die Ergebnisse und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

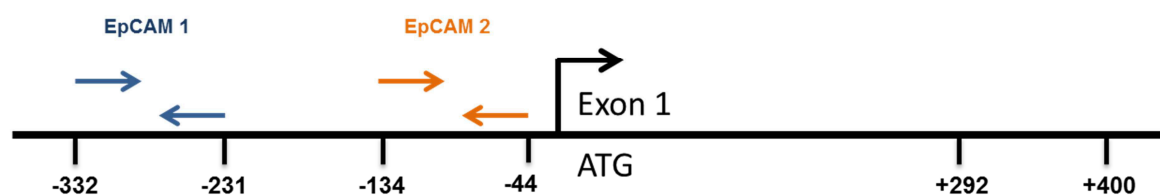
Dabei werden die DNA-gebundenen Proteine mit spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ -H3K4me3,  $\alpha$ -H3K27me3,  $\alpha$ -Pol II) präzipitiert, die DNA aufgereinigt und mittels quantitativer PCR wird die Menge an vormals gebundener DNA bestimmt. Die Primer hierfür lagen in der Promotor Region von *Epcam* und *Oct3/4*. Detailliert erläutert ist der genaue Ablauf dieser Methode in Kapitel 3.2.5.

Wiederum wurden pluripotente E14TG2  $\alpha$  ES Zellen durch die Generierung von EBs differenziert und zu bestimmten Zeitpunkten des Prozesses, nämlich Tag 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung, geerntet. Aus einem Teil der Zellen wurden die RNA und schließlich die cDNA gewonnen. Um eine Reduktion der EpCAM Expression auf mRNA Ebene auch in diesen Versuchen sicherzustellen, wurde die cDNA mittels qPCR vermessen. Die Ergebnisse drei verschiedener Versuche, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden, sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Wie erwartet war die Menge der EpCAM mRNA an den Tagen sieben und 21 (d7, d21) stark vermindert. Da das Expressionsmuster dem Verlauf der EpCAM Expression in der Zeitreihe in einem der vorangegangenen Abschnitte (siehe Abbildung 4.4) entsprach, wurde auf eine Bestimmung der Oct3/4 Expression auf transkriptioneller Ebene verzichtet.

Die Ergebnisse der ChIP am *Epcam* Promotor sind Abbildung 4.8 dargestellt, wobei jeder der vier Teilabschnitte (**A-D**) die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente zeigt. Für die interne Kontrolle und zur späteren Berechnung der Interaktion der einzelnen Proteine oder Modifikationen am Promotor wurde eine Input Kontrolle mitgeführt. Dabei wurde die ursprüngliche, unbehandelte Chromatinlösung in verschiedenen, aber bekannten Verdünnungsstufen präzipitiert und in der qPCR parallel mit den eigentlichen Proben vermessen. Mit Hilfe der Software des LightCyclers (LightCycler® 480 SW 1.5), den gemessenen Werten und den Konzentrationen der Input Kontrolle konnte die Steigung einer Geraden berechnet werden. Anhand dieser Geraden wiederum war es der Software möglich

die Messwerte der eigentlichen Proben in Werte umzurechnen. Der Vollständigkeit halber und zum leichteren Vergleich sind in den verbleibenden Diagrammen (**B**) bis (**D**) jeweils die entsprechenden Inputkontrollen abgebildet. Des Weiteren wurde die Spezifität jedes in der ChIP verwendeten Antikörpers getestet. Dazu wurden die Antikörper-behandelten, präzipitierten und aufgereinigten Chromatinlösungen mit Primern für ein spezielles Gen, *Cenpl*, verwendet, das sich am Zentromer des X-Chromosoms befindet und weder von Methylierungen der Histone betroffen ist, noch von der Polymerase II gebunden wird. Dadurch eignete sich dieses Gen hervorragend als Negativkontrolle, was durch die im Folgenden diskutierten Ergebnisse bestätigt wurde. In der präzipitierten DNA aller Proben und Ansätze war keinerlei *Cenpl* zu amplifizieren. Unspezifische Bindungen der Antikörper und ein Einfluss infolgedessen auf eventuelle Effekte waren somit auszuschließen.

#### qPCR primer:



**Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der *EpCAM* Promotorregion und der Bindestellen der in der Chromatin Immunopräzipitation verwendeten Primer.**

Die Bindestellen und das Design der Primer wurden in Anlehnung an Untersuchungen im humanen System gewählt (Lu *et al.* 2010). Der schwarze geknickte Pfeil und das ATG markieren dabei die Transkriptionsstartstelle (TSS) des Exon 1. In blau und orange sind die Bindestellen der beiden verwendeten Primerpaare an Position -332 und -134 zu sehen.

Die Primer für die Messung in der quantitativen PCR wurden in Anlehnung an die beiden Primer des humanen Systems an Position -630 und -354 entworfen und sind mit der entsprechenden Beschriftung der jeweiligen Position im Promotorbereich in Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der *EpCAM* Promotorregion und der Bindestellen der in der Chromatin Immunopräzipitation verwendeten Primer. dargestellt (Lu *et al.* 2010). Gezeigt sind im Folgenden Ergebnisse, die aus der



Messung mit Primerpaar 1 generiert und mit Primerpaar 2 bestätigt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Die statistische Signifikanz wurde, wie für alle Ergebnisse dieser Arbeit, mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. Die unterschiedlich hohen Signifikanzen werden in den Diagrammen dieser Arbeit wie folgt kategorisiert und mit Sternchen markiert:  $p \leq 0,05$  \*;  $p \leq 0,01$  \*\*;  $p \leq 0,001$  \*\*\*. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert von über 0,05 wurden als nicht signifikant eingestuft und blieben unmarkiert.

Diagramm (A) der Abbildung 4.8 zeigt ausschließlich die Ergebnisse der Inputkontrollen, vermessen mit Primerpaar 1 für EpCAM (linker Teil des Diagramms) oder Cenpl (rechter Teil des Diagramms). Ein Blick auf die einzelnen Säulenblöcke ließ den Einsatz gleicher DNA-Mengen für jede einzelne Probe (d0, d3, d7, d21) erkennen. Die Bindung der DNA-abhängigen RNA Polymerase II (Pol II) an den *Epcam* Promotor (siehe B) nahm im Verlauf der Differenzierung stark ab. Dies war in Diagramm (D) ebenfalls deutlich zu sehen.

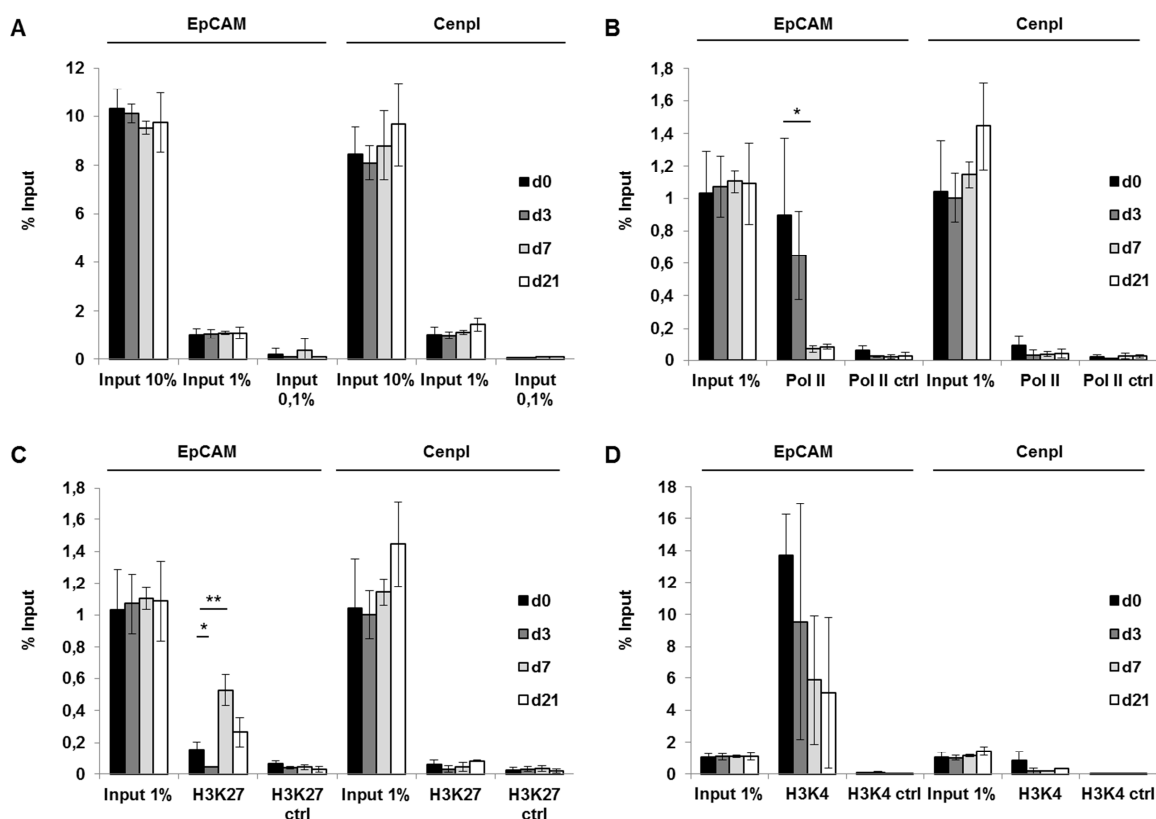
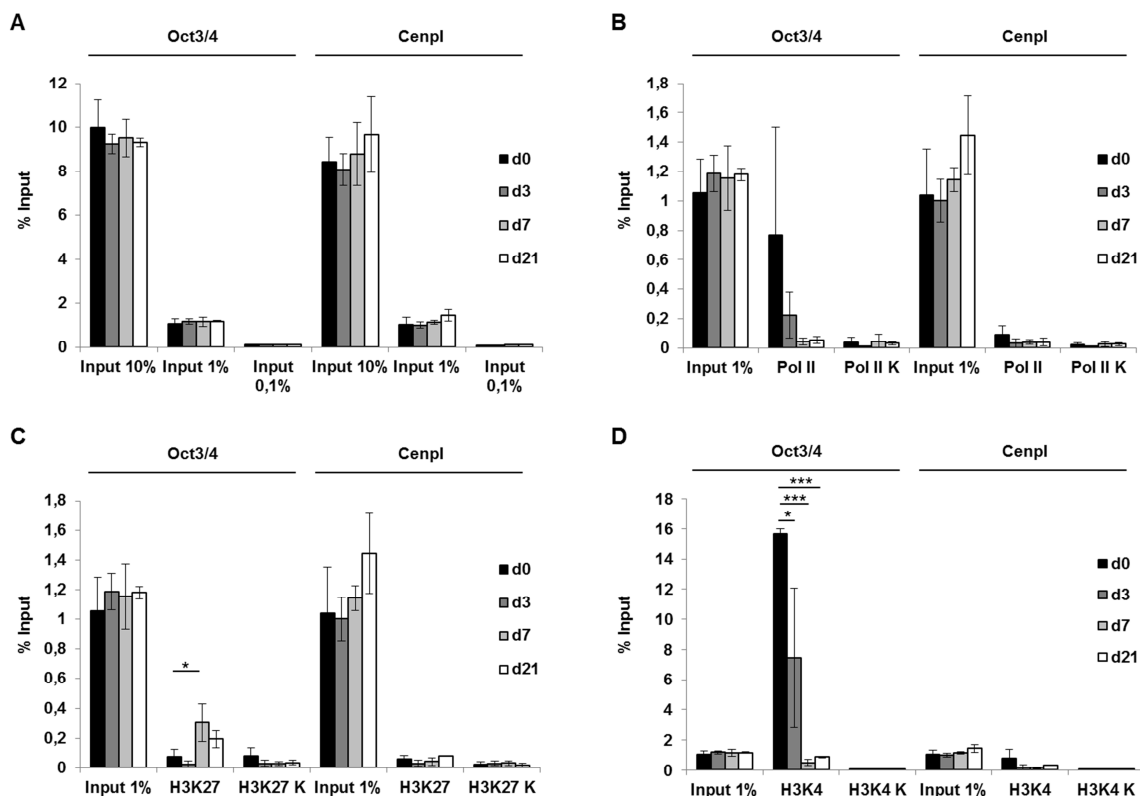


Abbildung 4.8: Chromatin Immunopräzipitation am *Epcam* Promotor.

Wie in 3.2.5 erläutert wurden E14TG2α ES Zellen der entsprechenden Differenzierungsstadien mit Formaldehyd behandelt, die Kerne isoliert und das Chromatin fragmentiert. Nachfolgend wurde unter Verwendung von Antikörpern gegen die Polymerase II (**B**), H3K27- (**C**), H3K4-Trimethylierung (**D**) eine Immunopräzipitation vorgenommen. Die präzipitierte DNA wurde aufgereinigt und mittels qPCR analysiert. Zum Vergleich wurden auch Proben der eingesetzten gesamten genomischen DNA untersucht (**A**). Diese wurde zur Normierung der anderen Proben eingesetzt. Während die Bindung von Pol II (**B**, siehe 3.Säulenblock) und H3K4me3 (**D**, siehe 3.Säulenblock) am *Epcam* Promotor geringer wird, nimmt sie für H3K27me3 (**C**, siehe 3.Säulenblock) zu. Als interne Negativkontrolle wurde die Bindung an den Promotor von *Cenpl* vermessen. Die Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Experimenten, die gemittelt und mit Standardabweichungen abgebildet wurden. Der Zusatz für die Trimethylierungen (me3) sind in der Beschriftung der Einfachheit halber nicht angegeben.

Hierbei handelte es sich um die Modifikation von Histon 3 durch eine Trimethylierung an Lysin 4 (H3K4me3; im Diagramm H3K4) und dem Promotor. Diese Modifikation ist ausschließlich an den Promotoren aktiv transkribierter Gene zu finden (Zhang *et al.* 2012). Das Gegenteil ist bei der Methylierung des gleichen Histons an Lysin 27 (H3K27me3; im Diagramm H3K27) der Fall. Diese reprimierende epigenetische Modifikation stieg mit zunehmendem Differenzierungsgrad erkennbar an (siehe **C**).



**Abbildung 4.9: Chromatin Immunopräzipitation am *Oct3/4* Promotor.**

E14TG2 $\alpha$  ES Zellen wurden differenziert, geerntet, gewaschen und mit Formaldehyd behandelt. Darauffolgend wurden rohe Kernextrakte hergestellt, das Chromatin isoliert und mittels Branson Sonifiers W-250 D fragmentiert. Die Chromatin-Lösung wurde dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert. DNA wurde unter Verwendung des Kits „NucleoSpin Gel and PCR Clean up“-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt, bevor eine Analyse durch quantitative Polymerasekettenreaktion durchgeführt werden konnte. Dabei diente als Vergleich die in die Immunopräzipitation eingesetzte genomische DNA, der Input in (A). Für die Proteine Pol II (B) und H3K4me3 (D) ist eine Abnahme, für H3K27me3 (C) eine Zunahme der Bindung an die DNA zu verzeichnen. Eine unspezifische Bindung der Antikörper wurde mit der Analyse der internen Kontrolle, Cenpl, ausgeschlossen. Gezeigt sind die gemittelten Messungen dreier separater Experimente. Der Zusatz für die Trimethylierungen (me3) sind in der Beschriftung der Einfachheit halber nicht angegeben.

Ein vergleichbares Bindungsmuster war auch in den Ergebnissen der Chromatin Immunopräzipitation für der *Oct3/4* Promotor in Abbildung 4.9 (A) bis (D) zu beobachten. Die Wechselwirkung der Polymerase II mit dem Promotor wurde, ebenso wie die Trimethylierung von Histon 3 an Lysin in Position 4 (H3K4me3) (siehe B und D) im Laufe der Differenzierung stark reduziert. Es war dagegen eine Zunahme

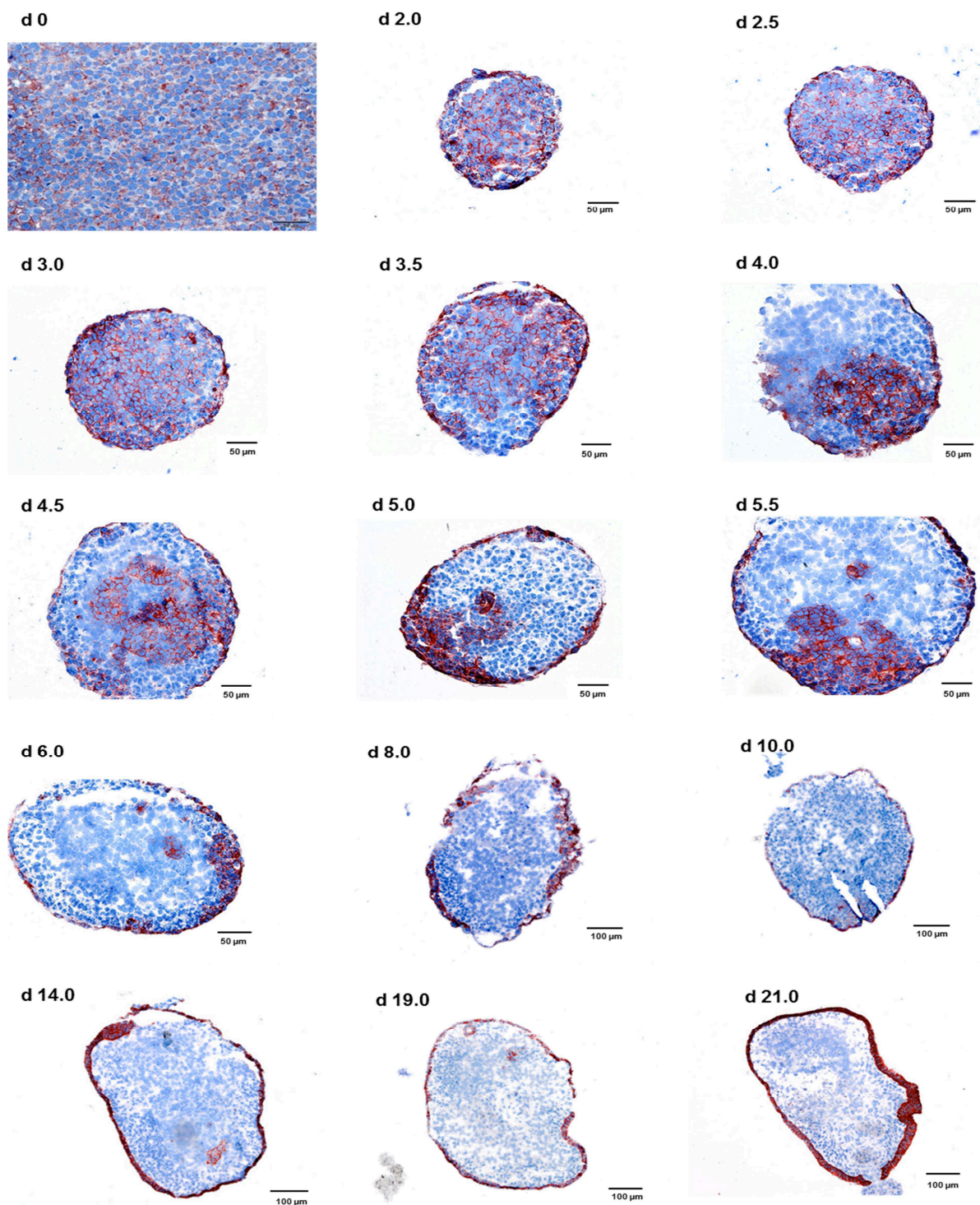
der Bindung des Histons mit der reprimierenden Lysin-Methylierung (H3K27me3) an den Promotor zu verzeichnen (Abbildung 4.9).

#### **4.1.5 Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in *embryoid bodies***

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.1.2 geben Auskunft darüber, dass EpCAM auf transkriptioneller Ebene am fünften Tag der Differenzierung signifikant reguliert wurde. Weiterhin konnte in diesem Teil der Arbeit eine sehr starke Reduktion von über neunzig Prozent des membranständigen EpCAM Proteins in Folge der Differenzierung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sind zwei Szenarien vorstellbar: entweder regulieren alle Zellen im Laufe der Differenzierung die Expression von EpCAM um ca. 90% homogen herunter oder es kommt zu einer heterogenen Regulation, bei der manche Zellen EpCAM vollständig verlieren, während andere Zellen das Protein weiterhin exprimieren.

Zur experimentellen Überprüfung dieser Hypothesen wurden pluripotente E14TG2 $\alpha$  ES Zellen in *hanging drops* ausplattiert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, gemäß Abschnitt 3.1.5 eingefroren, geschnitten, die Präparate getrocknet und fixiert. Diese Schnitte wurden anschließend mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper behandelt. Gezeigt sind repräsentative Schnitte und Färbungen jedes Zeitpunkts.

Bei Betrachtung der Abbildung 4.10 lassen sich die Schnitte in drei Gruppen einteilen: (1) Präparate mit einer gleichmäßigen und ubiquitären EpCAM Färbung (d0 – d3.5), (2) Präparate in welchen ein Anteil der Zellen EpCAM-positiv und ein Anteil EpCAM-negativ ist (d4 - 8) und (3) Präparate mit ca. 90% EpCAM-negativen Zellen, welche durch einen Saum EpCAM-positiver Zellen umrandet sind (d10 – d21). Zudem zeichneten sich ab dem vierten Tag der Differenzierung drei morphologisch unterschiedliche Zellpopulationen ab. Außer der dicht gepackten Population am äußeren Rand der EBs waren noch Zellen mit sehr großen Zellkernen zu erkennen. Die digitalen Aufnahmen dieser Präparate erschienen durch das große Zytoplasma und den lockeren Verbund der Zellen miteinander, unscharf und diffus. Sehr deutlich zu sehen war dies an den Tagen vier und fünfeinhalb (d4, d5.5).

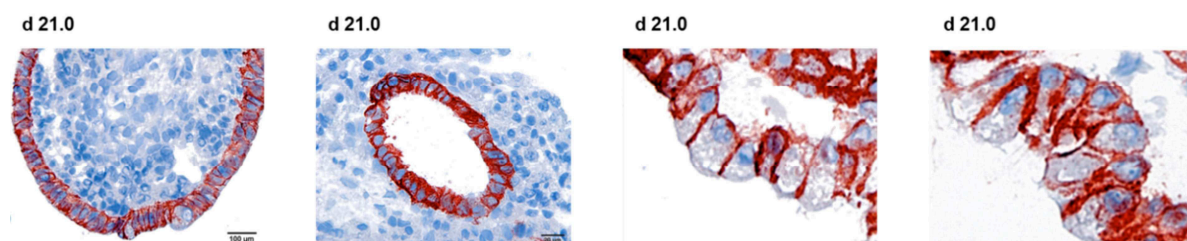


**Abbildung 4.10: Immunhistochemische Färbung des EpCAM Proteins in *embryoid bodies* verschiedener Differenzierungsstadien.**

E14TG2α ES Zellen wurden wie in 3.1.5 ausführlich erklärt geerntet, gewaschen und in *hanging drops* ausplattiert und nach entsprechender Zeit auf *ultra-low attachment*-Platten

transferiert. Im Anschluss daran wurden die gebildeten EBs schockgefroren, im Mikrotom geschnitten und mit EpCAM-spezifischen Antikörpern gefärbt (siehe 3.3). Mit den pluripotenten Ausgangszellen wurde in gleicher Weise verfahren. Die gefärbten Präparate wurden darauffolgend unter dem Mikroskop analysiert und digitale Bilder aufgenommen. Die Gesamtfärbung der Zellen nimmt im Verlauf, drastisch jedoch schon ab Tag 4 (d4) der Differenzierung, ab, bis ein äußerer Rand an stark positiven Zellen bleibt. Es sind repräsentative Präparate jedes Differenzierungsstadiums dargestellt.

Zwischen diesem und dem ersten beschriebenen Zelltyp waren des Weiteren Zellen der dritten Population auszumachen. Diese Zellen hatten stark verdichtete, kleine Zellkerne und waren gänzlich EpCAM negativ. Auch in der ersten Vergrößerungen der Abbildung 4.11 sind diese drei Populationen deutlich erkennbar. Weitere Vergrößerungen in Abbildung 4.11 zeigen Zellen mit einer starken EpCAM Expression, welche in der äußeren Umrandung der EBs oder in Zellen, die Einschlüsse umrahmen (siehe zweites Bild) lokalisieren. Diese Zellen wiesen eine epitheliale Morphologie auf, waren einschichtig organisiert und zeigten eine basolaterale EpCAM Färbung.



**Abbildung 4.11: Basolaterale EpCAM Expression am äußeren Rand der *embryoid bodies* und der Umrandung der Vakuolen.**

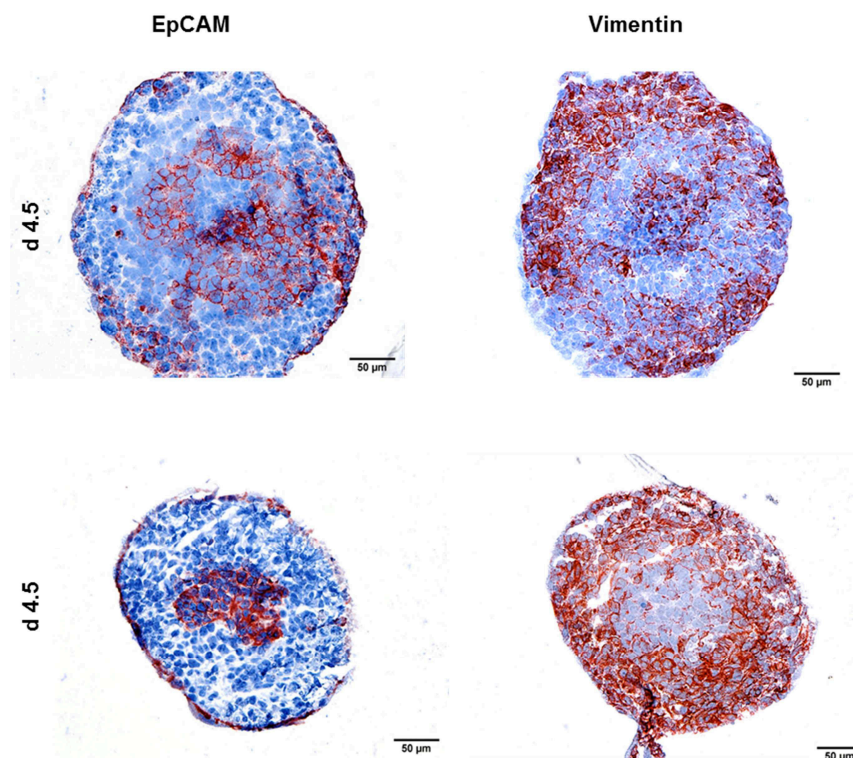
E14TG2 $\alpha$  ES Zellen wurden wie in 3.1.5 ausführlich erklärt geerntet, gewaschen und in *hanging drops* ausplattiert und nach entsprechender Zeit auf *ultra-low attachment*-Platten transferiert. Im Anschluss daran wurden die gebildeten EBs schockgefroren, im Mikrotom geschnitten und mit EpCAM-spezifischen Antikörpern gefärbt (siehe 3.3). Es konnte eine basolaterale Expression des EpCAM Moleküls in den Zellen am Rand des EBs oder dessen Vakuolen festgestellt werden. Gezeigt sind jeweils repräsentative Färbungen.

#### 4.1.6 EpCAM und Vimentin Expression schließen sich gegenseitig aus

Wie bereits in Abschnitt 4.1.5 erläutert, wurde die EpCAM Expression auf Einzelzell-Niveau untersucht. Dabei wurde eine selektive Regulation in den Zellen entdeckt (siehe Abbildung 4.10). Die äußeren Zellen waren im gesamten Verlauf der Differenzierung EpCAM-positiv und bildeten an Tag 21 der Differenzierung eine,



morphologisch betrachtet, epitheliale Umrandung, während die Zellen im inneren Teil der Struktur eine positive Färbung aufwiesen, die kontinuierlich schwächer wurde. Außerdem konnten die Zellen der EBs aufgrund der Morphologie in drei unterschiedliche Populationen eingeteilt werden, die Zellen der drei Keimblätter (Ekto-, Meso- und Endoderm) entsprechen könnten. Deshalb wurden Schnitte der in Abschnitt 4.1.5 verwendeten EBs mit einem Vimentin-spezifischen Antikörper behandelt. Dieses Protein ist ein Marker für die Entwicklung des mesodermalen Keimblatts (Weinhold *et al.* 2000). Eine Untersuchung der Expression von Markern der anderen beiden Keimblätter wurde für zukünftige Arbeiten angedacht.



**Abbildung 4.12: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin nach viertägiger Differenzierung embryonaler Stammzellen.**

Die Generierung von EBs erfolgte wie unter Punkt 3.1.5 erläutert. Nach dem Schockfrieren und Schneiden der Sphäroid-ähnlichen Strukturen wurden die Präparate mit EpCAM- und Vimentin-spezifischen Antikörpern behandelt. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene (beide d4.5), repräsentative EBs, die jeweils mit den zwei Antikörpern für EpCAM und Vimentin behandelt wurden. Die Färbung der beiden Proteine ist alternierend.

Abbildung 4.12 stellt zwei verschiedene EBs dar, die beide an Tag 4,5 geerntet und gefärbt wurden (siehe rechter Ausschnitt der Abbildung). Konsekutive Serienschritte

der EBs (ca. 4µm Abstand) wurden mit EpCAM- (siehe linker Ausschnitt der Abbildung 4.11) und Vimentin-spezifischen Antikörpern (siehe rechter Ausschnitt der Abbildung 4.11) angefärbt. Bei einem Vergleich der Färbungen von EpCAM und Vimentin in Serienschnitten eines EBs wurde eine sich gegenseitig ausschließende Expression beider Proteine festgestellt. Am Beispiel des unteren EBs bedeutete dies, dass EpCAM-positive Zellen im zentralen Kern der Struktur keinerlei Vimentin exprimierten und umgekehrt EpCAM-negative Zellen Vimentin positiv waren. Ein virtuelles Übereinanderlegen beider Bilder verdeutlicht die gegenläufige Expression von EpCAM und Vimentin an den beiden repräsentativen Beispielen.

## **4.2 Auswirkungen einer EpCAM Überexpression auf die Differenzierung in *embryoid bodies***

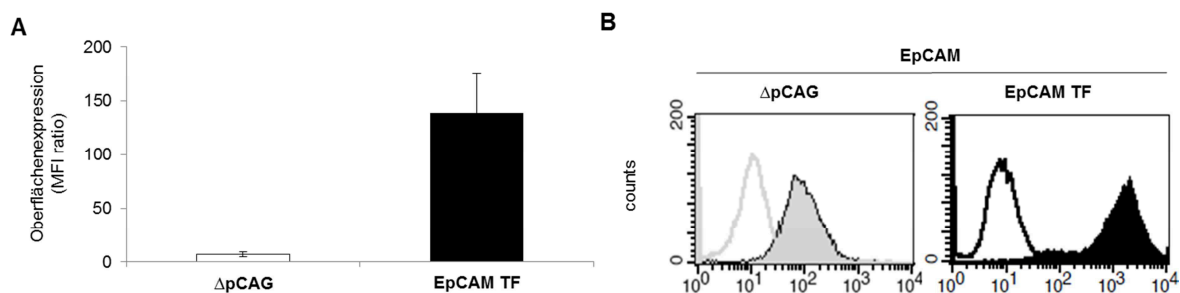
Im gesamten vorangegangenen Teil dieser Arbeit (siehe 4.1) wurde die *in vitro* Differenzierung und deren Auswirkungen auf die Expression von EpCAM sowie die Pluripotenzmarker SSEA-1 und Oct3/4 im Wildtyp-Hintergrund untersucht. Dabei wurde die Differenzierung mit Hilfe der Generierung von dreidimensionalen EBs eingeleitet und anhand der stark minimierten Oberflächenexpression von SSEA-1 und der verminderten mRNA Menge von Oct3/4 bestätigt. Auf der Protein- mRNA Ebene kam es im Zuge dessen zu einer etwa 90 prozentigen Reduktion von EpCAM. Allerdings konnte eine selektive Regulation von EpCAM in den innenliegenden beziehungsweise den Zellen der äußeren Umrandung von EBs festgestellt werden. Epigenetische Modifikationen des Histons 3 und eine verminderte Interaktion des *Epcam* Promotors mit der Polymerase II gaben erste Hinweise auf die Ursache der EpCAM Reduktion. Zuletzt wurde eine alternierende Expression von EpCAM und Vimentin ausgemacht.

Zusammenfassend ließ sich also ein Effekt der dreidimensionalen Differenzierung von ES Zellen auf die Expression von endogenem EpCAM aufdecken, wobei EpCAM selektiv in Epithelzellen erhalten blieb und in mesodermalen Zellen gänzlich fehlte. Um nun in der Umkehr einen eventuellen Einfluss von EpCAM auf die Differenzierung zu analysieren, wurde EpCAM ektopisch in E14TG2α ES Zellen exprimiert und Effekte auf die Morphologie und die Differenzierung.



#### 4.2.1 Überexpression von EpCAM in E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF

E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF und die dazugehörige Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG sowie alle im Folgenden genannten Zelllinien wurden von Matthias Hachmeister etabliert, kontrolliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit hauptsächlich die beiden bereits namentlich erwähnten Zelllinien untersucht wurden, wurde anfänglich die Überexpression von EpCAM an der Membran der Zellen nochmals überprüft.



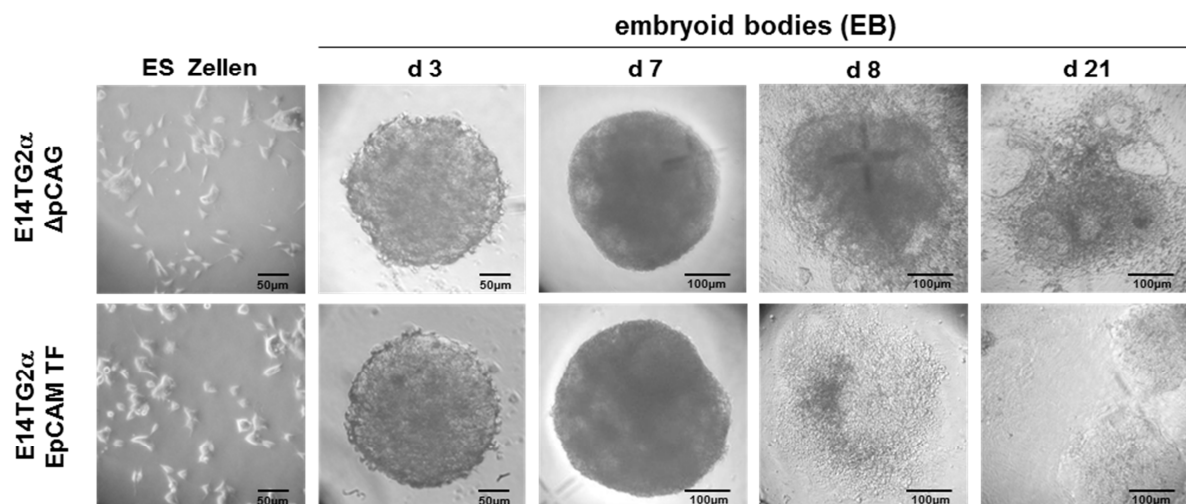
**Abbildung 4.13: Oberflächenexpression von EpCAM in stabilen E14TG2 $\alpha$  Transfektanten.**

Pluripotente E14TG2 $\alpha$  ES Zellen wurden mit dem Überexpressionsplasmid 141pCAG::EpCAM-TF oder dem Leervektor 141pCAG transfiziert (siehe 3.1.6 und 2.5). Mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.1.7) konnte die Expression von EpCAM an der Oberfläche von E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (schwarz) im Vergleich zur Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (weiß/grau) bestimmt werden. Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse von drei verschiedenen Experimenten im Säulendiagramm (A) und die Histogramme einer repräsentativen Messung aus drei unabhängigen Experimenten (B).

Hierfür wurden in drei unabhängigen Experimenten Zellen geerntet, mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper behandelt und unter Verwendung eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers im Durchflusszytometer analysiert. Wie dem Säulendiagramm der Abbildung 4.13 (A) zu entnehmen, war in der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (schwarz) die Expression von EpCAM an der Oberfläche 20,04-fach höher als in der Kontrollzelllinie (weiß). Diese erhöhte Menge von EpCAM an der Plasmamembran ist im repräsentativen Histogramm in (B) anhand der starken Verschiebung der EpCAM Fluoreszenz ersichtlich. Bei den offenen Kurven handelte es sich jeweils um Kontrollfärbungen, die ohne den Primärantikörper durchgeführt wurden.

#### 4.2.2 EpCAM Überexpression hat keine ersichtlichen Einfluss auf die EB Morphologie

Nachdem die Überexpression von EpCAM in der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF sichergestellt war, wurde die Morphologie der generierten EBs beider stabiler Transfektanten verglichen. Zu diesem Zweck wurden Zellen geerntet, die Einzelzellsuspension mit Differenzierungsmedium zu einer homogenen Lösung mit  $2,5 \cdot 10^3$  Zellen/ml verdünnt und in 20  $\mu$ l Tropfen auf Deckel von Zellkulturschalen aufgebracht. Nach drei Tagen bei 37°C wurden die Zellen in *ultra-low attachment*-Multiwellplatten transferiert, ehe sie an Tag sieben des Experiments für einen oder 14 weitere Tage auf Gelatine inkubiert wurden. Der genaue Ablauf zur Erzeugung dieser Sphäroid-ähnlichen Strukturen ist in Abbildung 4.1 (A) dargestellt und in Abschnitt 3.1.5 genauestens erläutert.



**Abbildung 4.14: Vergleich der Morphologien von *embryoid bodies* der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF und der Kontrollzelllinie.**

Die Herstellung der EBs wurde gemäß 3.1.5 durchgeführt. Es wurden die Morphologien der Überexpressions-Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF und der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG miteinander verglichen. Repräsentative EBs verschiedener Differenzierungsstufen beider Zelllinien wurden analysiert und digital fotografiert. Es waren keine morphologischen Unterschiede zwischen EBs beider Zelllinien ersichtlich.

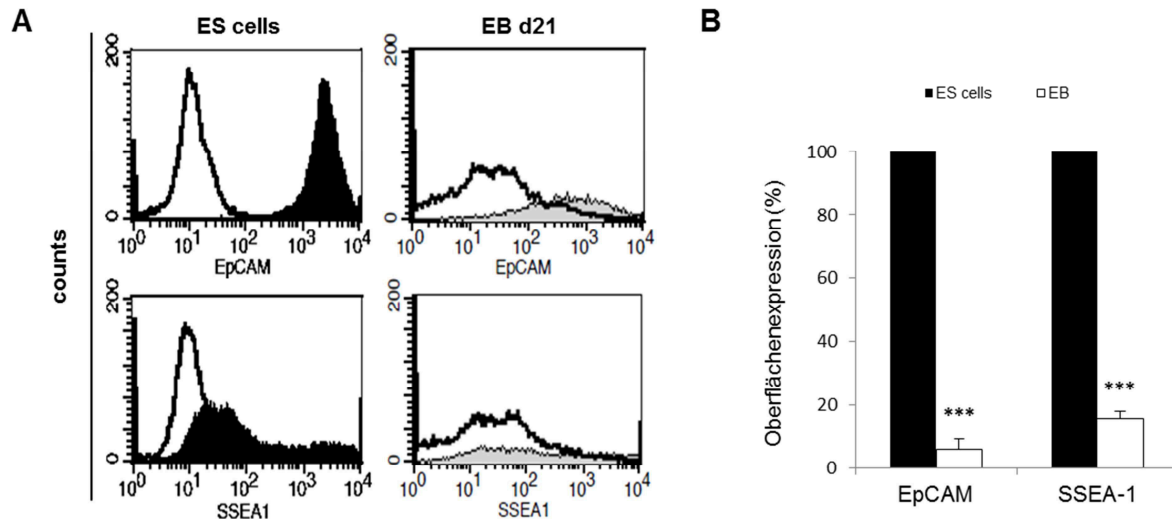
In Abbildung 4.14 werden zum einen die pluripotenten Zellen, wie auch die daraus generierten EBs der Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (unten) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (oben) miteinander verglichen.

Die Ausgangszellen beider Zelllinien wiesen durch die Morphologie der Kolonien auf einen pluripotenten Zustand hin, da sie kompakt, rund und ohne sichtbare Fortsätze waren. An Tag drei (d3) des Experiments waren ebenfalls keinerlei Unterschiede in der Form oder der Dichte der erzeugten EBs zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung änderten sich bei den EBs beider Zelllinien Form und Dichte gleichermaßen, was somit nicht mit der Überexpression in Verbindung stand. Auch die Adhärenz auf Gelatine war unbeeinflusst. Gezeigt sind repräsentative Bilder der einzelnen Stadien.

#### **4.2.3 EpCAM Überexpression kann eine 3D-Differenzierung der Stammzellen nicht verhindern**

Neben der Morphologie wurde in den beiden beschriebenen E14TG2 $\alpha$  Transfektanten mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression von EpCAM und dem Pluripotenzmarker SSEA-1 untersucht. Dazu wurden pluripotente und differenzierte Zellen (im Diagramm ES cells und d21) mit spezifischen Antikörpern gefärbt und unter Verwendung von Fluorescein-markierten Zweitantikörpern im FACS-Calibur analysiert. Kontrollfärbungen wurden jeweils ohne die Behandlung mit dem ersten Antikörper durchgeführt und sind als offene Kurven in den Histogrammen zu sehen. Vier repräsentative Histogramme aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 4.15 (A) visualisiert. Dabei gilt das bereits in Abbildung 4.2 verwendete Farbschema, das die pluripotenten Zellen in schwarz, die differenzierten Zellen an Tag 21 in grau abbildet. Der Vergleich der Histogramme beider Differenzierungsstadien zeigte eine deutlich sichtbare Reduktion von SSEA-1 (untere Histogramme). Obgleich die Kurve im pluripotenten Zustand schon eine leichte Überlappung mit dem Histogramm der Kontrollfärbung aufwies, was auf eine spontane Differenzierung einiger Zellen aufmerksam machte, wurde die Expression in Folge der Differenzierung noch weitaus drastischer reduziert. Erstaunlicherweise war trotz der exogenen Expression von EpCAM auch ein Rückgang dieses Flag-markierten EpCAM Moleküls an der Membran der Zellen zu vermerken. Dabei wurde bewusst der starke CAG (CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin)-Promotor verwendet,

der eine hohe und stabile Expression auch im Laufe von Differenzierungsprozessen erzielen sollte (Alexopoulou *et al.* 2008).



**Abbildung 4.15: Oberflächenexpression von EpCAM und SSEA-1 der Zelllinie E14TG2-EpCAM-TF nach 21-tägiger Differenzierung.**

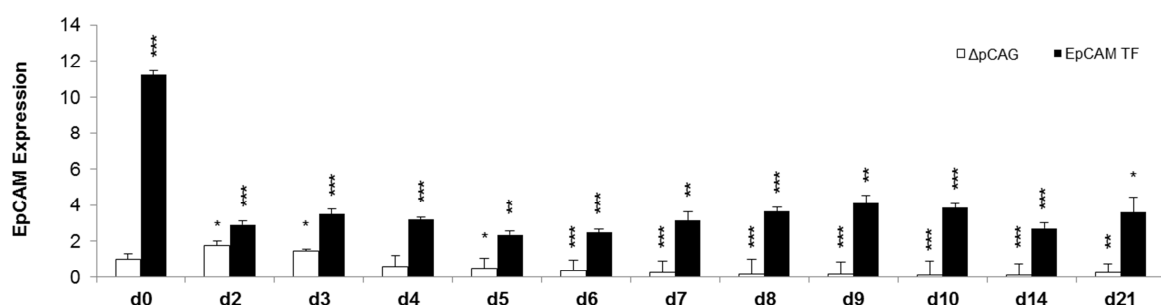
Zellen des Überexpressionssystems E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF wurden wie in 3.1.5 beschrieben mittels *hanging drop*-Methode differenziert und im Durchflusszytometer mit Hilfe eines EpCAM-spezifischen Antikörpers analysiert (siehe 3.1.7). (A) zeigt repräsentative Histogramme sowohl für die Messung der pluripotenten (schwarz), sowie der differenzierten Zellen (grau). Es wurde eine Reduktion der beiden Proteine EpCAM und SSEA-1 an der Oberfläche im Vergleich zu pluripotenten Zellen ermittelt. Die Werte von drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und sind in (B) aufgetragen.

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind in (B) zusammengefasst, wobei auf die Expression pluripotenter Zellen (schwarz) normiert wurde. Dies verdeutlichte die starke Regulation von endo- wie auch exogenem EpCAM, die bereits anhand des Histogramms geschildert wurde. Verglichen mit den pluripotenten Zellen verblieben im Mittel 5,86 ( $\pm 3,53$ ) Prozent des Proteins an der Membran der differenzierten Stammzellen. Mit 84,4 Prozent war die Reduktion von SSEA-1 in den drei Versuchen sehr hoch.

Die oben beschriebenen Versuche stellten eine Differenzierung der EpCAM-überexprimierenden Stammzellen sicher und wiesen auf eine stark negative Regulation von endo- und exogen exprimiertem EpCAM an der Zelloberfläche hin. Um auch die transkriptionellen Auswirkungen zu analysieren, wurden Zellen unter

Verwendung der *hanging drop*-Methode *in vitro* differenziert (siehe 3.1.5). Anschließend wurden die EBs an den verschiedenen Tagen der Zeitreihe geerntet, die RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Diese wurde im Anschluss daran, wie in Abschnitt 3.2.3 erläutert, mit speziellen Primern in der RealTime quantitativen PCR vermessen. Die Normierung der Werte auf Tag null (d0) der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG und die gemeinsame Auftragung in Abbildung 4.16, Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18 ermöglichten eine einfache Gegenüberstellung der transkriptionellen Regulation der Überexpressions- und Kontrollzelllinie. Die Kontrollzellen E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG zeigten, in einem ähnlichen Expressionsmuster wie dem der Wildtyp-Zellen, im Laufe der Differenzierung eine abnehmende Menge an mRNA.

Schon in Abschnitt 4.2.1 wurde im Zuge der Charakterisierung der pluripotenten Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF eine Überexpression bewiesen, die mit Abbildung 4.16 (siehe d0) auch auf transkriptioneller Ebene belegt werden konnte. Wie durchflusszytometrisch für das Protein EpCAM bestimmt (siehe Abbildung 4.15), kam es auch transkriptionell zu einer Abnahme von EpCAM. Bereits am zweiten Tag nach Initiation der Differenzierung sank EpCAM auf ein Drittel der anfänglichen Expression. Ungeachtet eines stärkeren Differenzierungszustands der Zellen änderte sich die Menge an EpCAM mRNA anschließend nur noch geringfügig. Die Expression blieb stetig mindestens doppelt so hoch wie die der pluripotenten Kontrollzellen. Die gemittelten Werte für die Überexpressionszelllinie wurden als hoch signifikant berechnet.

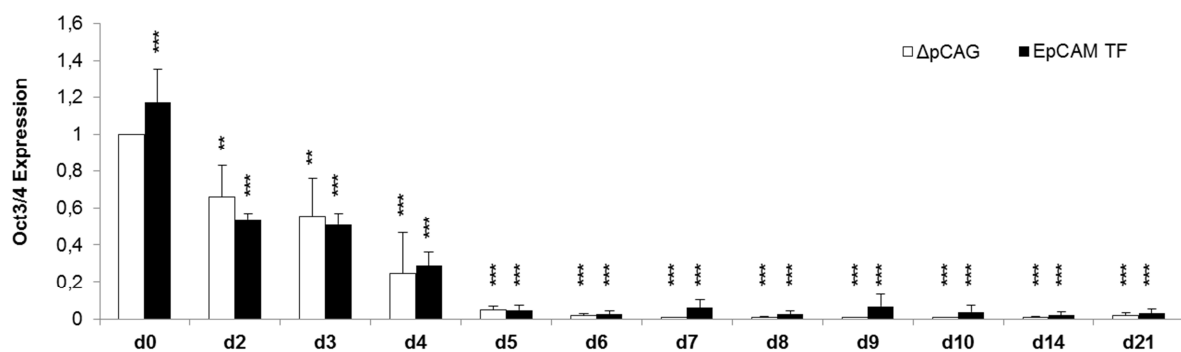


**Abbildung 4.16: Sinkende Expression von EpCAM im Überexpressionssystem auf transkriptioneller Ebene.**

Zellen wurden *in vitro* differenziert (siehe 3.1.5) und geerntet. Anschließend wurde die RNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und diese mittels quantitativer PCR vermessen (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Die Expression der mRNA der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (schwarz) wurde

relativ zur Expression an Tag 0 der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (weiß) angegeben. Trotz starker anfänglicher Reduktion blieb die Expression auf diesem konstant hohen Niveau. Die Standardabweichungen wurden aus vier eigenständigen Experimenten berechnet. Die Signifikanzen aller Werte beziehen sich auf den Wert der pluripotenten Wildtyp-Zellen (d0; weiß).

Diese weiterhin bestehende, höhere Expression von EpCAM in Zellen mit dem ektopischen Expressionsplasmid wurde als Anlass genommen, eine etwaige Auswirkung auf den Differenzierungsstatus transkriptionell zu analysieren. Dabei wurde unter Verwendung der oben generierten cDNA mit spezifischen Primern Oct3/4 amplifiziert. Die Werte entstammten drei unabhängigen Versuchen, die gemittelt, auf Tag null der Kontrollzelllinie normiert und mit Standardabweichungen und Signifikanzen in Abbildung 4.17 aufgetragen wurden. Wieder sind die Regulationen als hoch signifikant einzuschätzen.



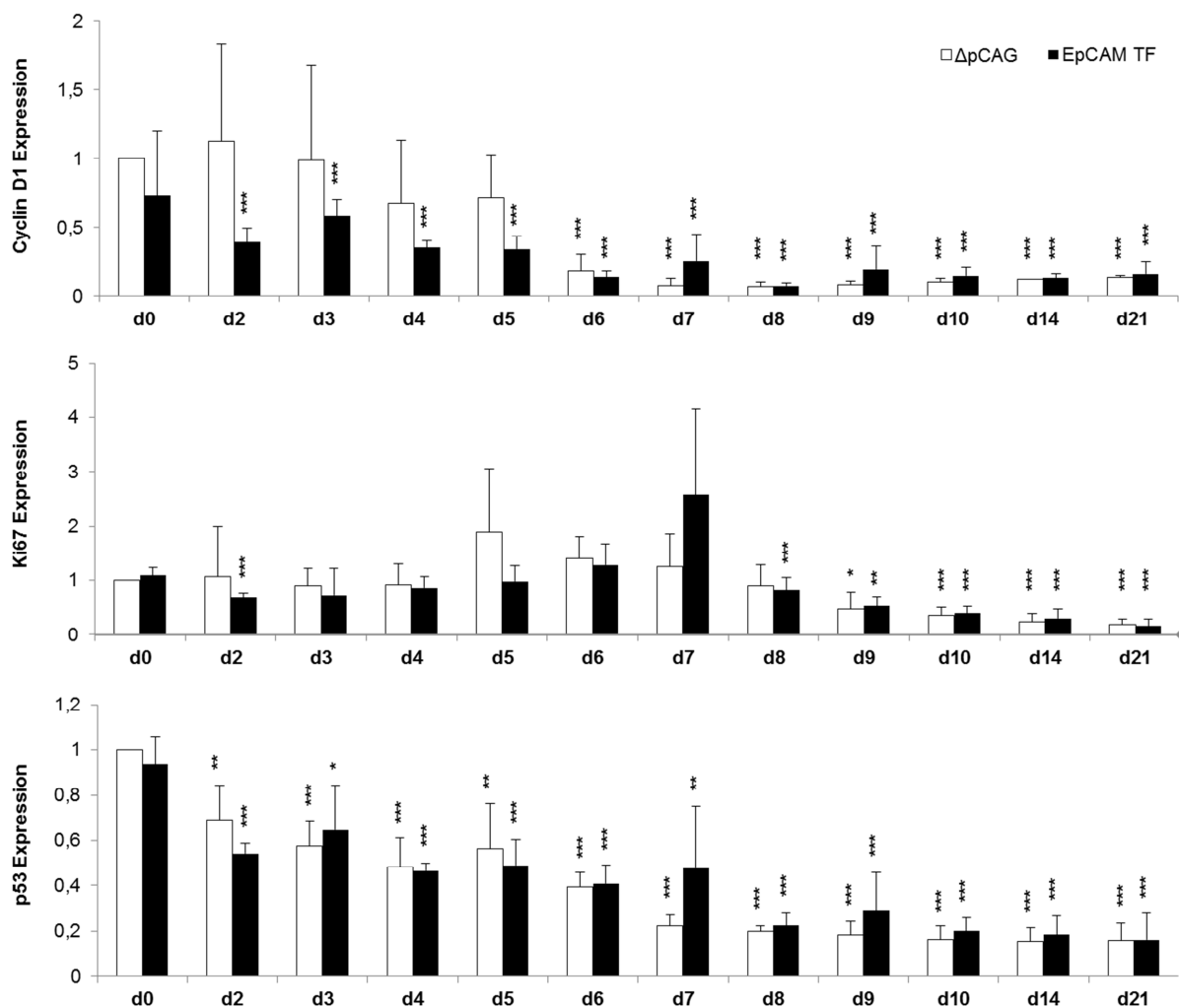
**Abbildung 4.17: Oct3/4 wird infolge der Differenzierung auch in Überexpressionszelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF auf transkriptioneller Ebene reduziert.**

Nach Differenzierung von E14TG2 $\alpha$  ES Zellen (siehe 3.1.5) wurden die Zellen geerntet, die RNA wurde wie in 3.2.2 beschrieben isoliert und die synthetisierte cDNA im LightCycler vermessen. Im Laufe des Differenzierungsprozesses ist ein Rückgang des Transkripts sowohl in den Zellen mit Expressionsplasmid (schwarz), wie auch in der Kontrollzelllinie (weiß) zu erkennen. Die Berechnungen des Mittelwerts wurden aus vier separaten Versuchen und Messungen durchgeführt und aufgetragen. Die Signifikanzen aller Werte beziehen sich auf den Wert der pluripotenten Wildtyp-Zellen (d0; weiß).

Anders als bei der Analyse von EpCAM gibt es bei Oct3/4 kaum Unterschiede im Expressionsmuster der beiden Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG. In beiden fiel die Expression erst langsam ab, um ab Tag fünf (d5) weniger als zehn Prozent der mRNA Menge, verglichen mit Tag null (d0) der Kontrollzelllinie, aufzuweisen.

#### 4.2.4 Keine Regulation von Proliferations- und Zellzyklusmarkern aufgrund ectopischer EpCAM Expression

Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 für die Wildtyp-Zelllinie E14TG2 $\alpha$  geschehen, wurden auch für das Überexpressionssystem die Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und p53, sowie der Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Wieder wurde jeder gemessene Wert der jeweiligen Differenzierungsstadien und Marker auf den der entsprechenden pluripotenten Kontrollzellen normiert und ist in Abbildung 4.18 dargestellt.



**Abbildung 4.18: Keine Auswirkungen von ectopischer EpCAM Expression auf die Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, Ki67 und p53 während der Differenzierung.**

Zellen wurden *in vitro* differenziert (siehe 3.1.5) und geerntet. Daraufhin wurde die RNA zu cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.2) und die Menge an Transkript mittels qPCR analysiert (3.2.3). Alle Werte wurden jeweils auf den Wert Tag 0 (d0) der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ -ΔpCAG normiert. Ein Vergleich der beiden Zelllinien zeigt, dass die Expression der einzelnen Marker sich nicht signifikant unterscheidet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen

wurden aus vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Signifikanzen aller Werte beziehen sich auf den Wert der pluripotenten Wildtyp-Zellen (d0; weiß).

Wie die hohen Standardabweichungen in den einzelnen Diagrammen zeigen, gab es innerhalb der drei unabhängigen, verwendeten Versuche teils hohe Schwankungen. Balken ohne Markierungen weisen außerdem auf eine fehlende Signifikanz der Daten einzelner Zeitpunkte hin.

Zwischen den beiden Zelllinien waren kaum Unterschiede im Verlauf der Expression aller drei Marker zu erkennen. Des Weiteren entsprachen die Expressionsmuster der drei Marker denjenigen der Wildtyp-Zellen in Abbildung 4.5. Dies ließ vermuten, dass die exogene Expression von EpCAM während der Differenzierung keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf Proliferation und Zellzyklus hat oder andere Zellzyklusregulatoren beeinflusst werden.

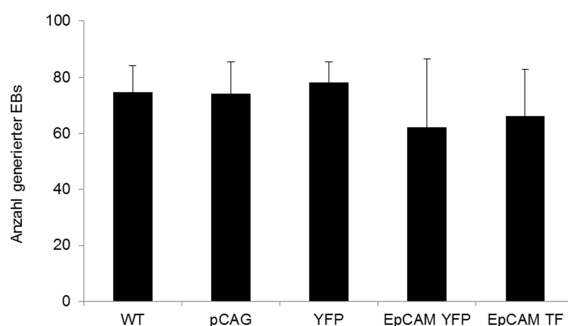
#### **4.2.5 Einfluss einer exogenen EpCAM Expression auf die kardiomyozitäre Differenzierung**

Neben seiner Funktion in der Signaltransduktion in humanen Zellen (Denzel *et al.* 2009, Maetzel *et al.* 2009) und seiner Rolle in der Proliferation muriner und humaner embryonaler Stammzellen (Gonzalez *et al.* 2009, Ng *et al.* 2010) wurde das Protein EpCAM von Litvinov *et al.* bereits 1994 auch als homophiles Zelladhäsionsmolekül beschrieben (Litvinov *et al.* 1994a, Litvinov *et al.* 1994b, Litvinov *et al.* 1997). Diese verschiedenen Funktionen warfen die Frage nach einem Phänotyp der EpCAM Überexpression in Zusammenhang mit der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen auf.

Vorerst aber sollte bezüglich der Überexpression von EpCAM eine potentielle Auswirkung auf die Bildung von EBs im Allgemeinen geklärt werden. Deshalb wurden von den fünf verschiedenen Zelllinien E14TG2 $\alpha$  Wildtyp (WT), E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (pCAG), E14TG2 $\alpha$ -YFP-(YFP), E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-YFP (EpCAM-YFP) und E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (EpCAM-TF) pluripotente Zellen geerntet und gemäß Abschnitt 3.1.5 zu 20 $\mu$ l Tropfen ausplattiert. Am Tag drei der Differenzierung wurden die Zellen für diesen Versuch in gängige Multiwellplatten transferiert, um eine Zählung der gebildeten Strukturen unter Zuhilfenahme eines Mikroskops zu ermöglichen. Die



verwendeten Zelllinien waren, neben den nicht-transfizierten Wildtyp-Zellen, zwei verschiedenen Expressionssystemen zuzuordnen. Zusätzlich zu dem Flag-markierten System mit der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG wurde das Ergebnis dieses Experiments mit einem weiteren, dem YFP-modifizierten, abgesichert. Der Mittelwert der Effizienz der EB Bildung (n=11) ist mit Standardabweichungen in Abbildung 4.19 wiedergegeben.



**Abbildung 4.19: Anzahl generierter *embryoid bodies* verschiedener Zelllinien.**

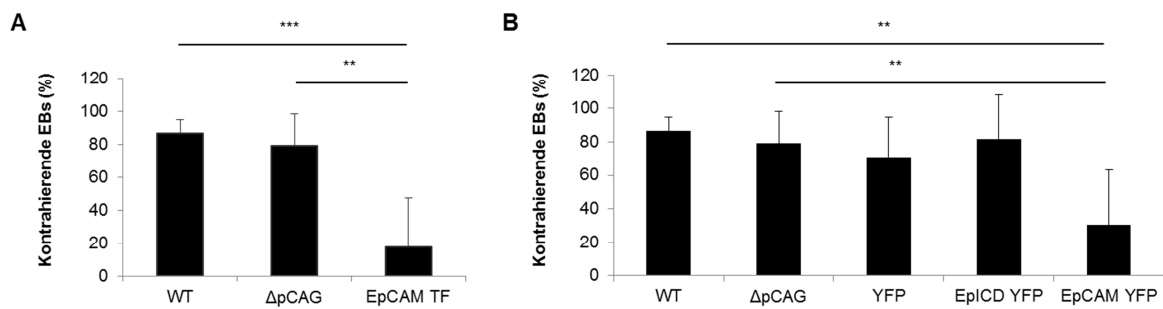
Laut 3.1.5 wurden Zellen kultiviert und Sphäroid-ähnliche Strukturen generiert. Die Anzahl der EBs jeder Zelllinie wurde gezählt und der Mittelwert aus unabhängigen Versuchen (n=11) wurde im Säulendiagramm aufgetragen. Die Unterschiede waren nicht signifikant, somit bilden die einzelnen Zelllinien alle im gleichen Maße EBs.

Neben dem Wildtyp (E14TG2 $\alpha$ ) wurden die Kontrollen E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG und E14TG2 $\alpha$ -YFP im Diagramm aufgetragen. Durch den Vergleich der drei beinahe identischen Säulen konnte ein Einfluss aller Maßnahmen zur Generierung stabiler Zelllinien, wie beispielsweise die Transfektion oder die Selektion mittels Puromyzin, ausgeschlossen werden. Somit war es möglich die mit dem Leerplasmid transfizierten Zellen als Kontrollen für die folgenden Versuche einzusetzen. Die EpCAM-überexprimierenden Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-YFP und E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF wiesen auf den ersten Blick eine geringere Anzahl an erzeugten EBs auf, jedoch zeigten die Standardabweichungen leichte Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen auf. Zusammenfassend aber zeigte das Diagramm eine Zelllinien- und Modifikations-unabhängige, ähnliche Frequenz in der Bildung von EBs. Die Unterschiede in der Generierung von EBs aus den verwendeten Zelllinien waren nicht signifikant. Für ein präzises Ergebnis wurden in die Zählung der EBs nur

unbeschädigte, ganzheitliche und zusammenhängende Strukturen einbezogen. Es gab diesbezüglich keinerlei Zelllinien-abhängige Unterschiede.

Der Phänotyp eines Organismus ist als die Summe aller morphologischen und physiologischen Merkmale bekannt. Die vergleichende Untersuchung der Morphologie (Abschnitt 4.2.2) konnte keine Abweichung in Form, Größe, Struktur oder Dichte der aus der Überexpressionszelllinie erzeugten EBs erkennen lassen. Während der Durchführung bereits beschriebener Experimente kristallisierte sich ein Phänotyp heraus. Im Zuge der Differenzierung kam es bei Wildtyp-Zellen zur spontanen Bildung von Kardiomyozyten, die innerhalb der EBs kontraktile Bereiche generierten. Die Entwicklung muriner und humaner embryonaler Stammzellen zu sogenannten *in vitro* generierten Kardiomyozyten wurde bereits beschrieben (Mummery *et al.* 2007) und konnte somit im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Im Folgenden wurden aus pluripotenten Zellen beider Expressionssysteme EBs generiert (siehe 3.1.5), die zwischen Tag acht und zehn mikroskopisch auf kontraktile Zellen untersucht wurden. Dabei wurden der Wildtyp und die Kontrollen (E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG und E14TG2 $\alpha$ -YFP) stets am selben Tag wie die entsprechenden EpCAM-überexprimierenden Zelllinien überprüft. Diesem Experiment wurde außerdem eine weitere Zelllinie, E14TG2 $\alpha$ -EpICD-YFP, hinzugefügt, welche von Matthias Hachmeister etabliert wurde und ausschließlich den intrazellulären Anteil von EpCAM exogen exprimiert. Dieser wird in humanen Zellen üblicherweise durch regulierte Intramembranproteolyse (RIP) vom membranständigen Teil des EpCAM Moleküls abgespalten und transloziert in den Nukleus humaner Karzinomzelle, um dort durch Bindung von Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene zu regulieren (Maetzel *et al.* 2009, Chaves-Perez *et al.* 2013). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind Abbildung 4.20 zu entnehmen. Dabei wurde die Abbildung in zwei Diagramme aufgeteilt, um die einzelnen Systeme unabhängig betrachten zu können. In **(A)** wurden die Werte des Flag-modifizierten, in **(B)** die des YFP-markierten Expressionssystems abgebildet. Beide Kontrollzelllinien zeigen, verglichen mit den untransfizierten Wildtyp-Zellen (WT), eine vergleichbare Frequenz der Differenzierung zu Kardiomyozyten.



**Abbildung 4.20: Anzahl kontrahierender *embryoid bodies* in zwei verschiedenen Zellsystemen zur exogenen Expression von EpCAM.**

Pluripotente Zellen wurden wie in 3.1.5 erläutert *in vitro* differenziert. Nach siebentägiger Differenzierung ohne Adhäsion wurden die EBs auf Gelatine-beschichtete Platten transferiert und an den Tagen acht bis zehn auf kontrahierende EBs untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Systeme zur exogenen Expression von EpCAM verwendet, die zum einen mit einem Flag-Tag (**A**), zum anderen mit einem YFP-Tag (**B**) modifiziert waren. In beiden Systemen ist eine Reduktion der Zahl an kontrahierenden EBs in den Zelllinien zu verzeichnen, die das modifizierte exogene EpCAM Molekül in voller Länge exprimieren. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

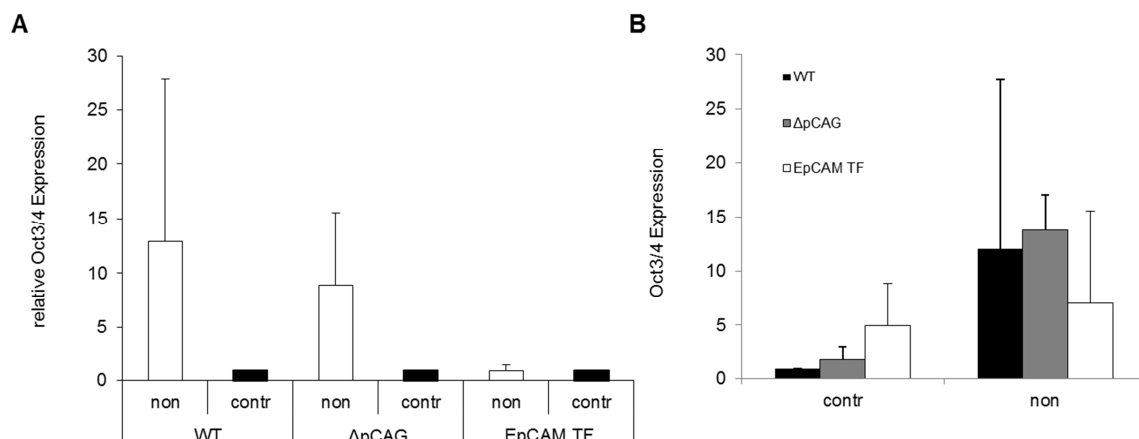
Auch die Zelllinie, die ausschließlich den intrazellulären Anteil von EpCAM exprimiert (E14TG2α-EpiCD-YFP) wies eine vergleichbare Häufigkeit der Differenzierung zu Kardiomyozyten auf. In Kontrast hierzu war die Bildung von kontrahierenden EBs durch EpCAM-TF und EpCAM-YFP-exprimierenden E14TG2α ES Zelllinien um 79,6 bzw. 65 Prozent im Vergleich zu Wildtyp- und Kontrollzellen reduziert. Allerdings konnten in zwei von 12 Experimenten auch in EBs der Überexpressionszelllinien E14TG2α EpCAM-TF und EpCAM-YFP mit fortschreitender Zeit Kontraktionen beobachtet werden. Zwei wesentliche Merkmale müssen deshalb festgehalten werden: eine Überexpression von EpCAM induzierte (1) keine vollständige Hemmung der Kardiomyozytenbildung an Tag 8-10 und (2) kam es teilweise dennoch zu einer klaren zeitlich verzögerten Bildung von kontraktilem Bereich. Entsprechend muss von einer starken und transienten Hemmung der kardiomyozitären Differenzierung durch EpCAM ausgegangen werden.

#### 4.2.6 Transkriptionelle Regulation von EpCAM, Oct3/4 und $\alpha$ -CAA in kontrahierenden EBs

Die Experimente des vorhergehenden Abschnitts beschrieben die Entwicklung einzelner Zellen der Sphäroid-ähnlichen Strukturen zu kontraktile Herzmuskelvorläuferzellen, den Kardiomyozyten. Die Erkenntnis, dass exogenes, stark exprimiertes EpCAM diesen Differenzierungsprozess transient hemmt, ließ über ein unterschiedliches Differenzierungsstadium der kontrahierenden und nicht-kontrahierenden Populationen spekulieren. Wie in Abschnitt 4.1.2 und 4.2.3 beschrieben kam es mit zunehmender Differenzierung der Zellen zu einem Abfall von EpCAM auf Protein- und transkriptioneller Ebene. Gäbe es nun bezüglich der Kontraktion einer Zelle oder eines gesamten EBs Unterschiede im Grad der Differenzierung, so ließe sich möglicherweise auch eine verschieden starke EpCAM Expression nachweisen.

Aus diesem Grund wurden EBs generiert (siehe 3.1.5), in *ultra-low attachment*-Platten inkubiert, auf Gelatine-beschichtete Platten transferiert und nach zwei bis drei Tagen in die beiden Untergruppen „kontrahierend“ und „nicht-kontrahierend“ eingeteilt. Die beiden Untergruppen wurden separat geerntet, deren RNA parallel isoliert und cDNA synthetisiert (siehe 3.2.2). Mit spezifischen Primern und mit Hilfe der RealTime quantitativen PCR (siehe 3.2.3) wurde der Differenzierungsgrad der Zellen durch die Analyse der Oct3/4 mRNA Expression bestimmt. Die gemittelten Messungen biologischer Triplikate wurden auf die Werte der jeweiligen kontrahierenden (contr; schwarz) EBs normiert und sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Diese Auftragung ermöglichte den direkten Vergleich innerhalb einer Zelllinie.

Aus diesen Experimenten ging hervor, dass die Menge an Oct3/4 mRNA in nicht-kontrahierenden EBs von Wildtyp- und Kontrollzellen im Mittel um den Faktor 14,8 bzw. 10,2 erhöht war im Vergleich zu kontrahierenden EB derselben Linien (Abbildung 4.21 (A)). Diese Ergebnisse deuten auf einen stärkeren Grad der Pluripotenz in nicht-kontrahierenden EBs dieser beiden Zelllinien hin. Im Gegensatz hierzu gab es keinen Unterschied in der Menge an Oct3/4 mRNA in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs der E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF ES Zelllinie (Abbildung 4.21 (A)).



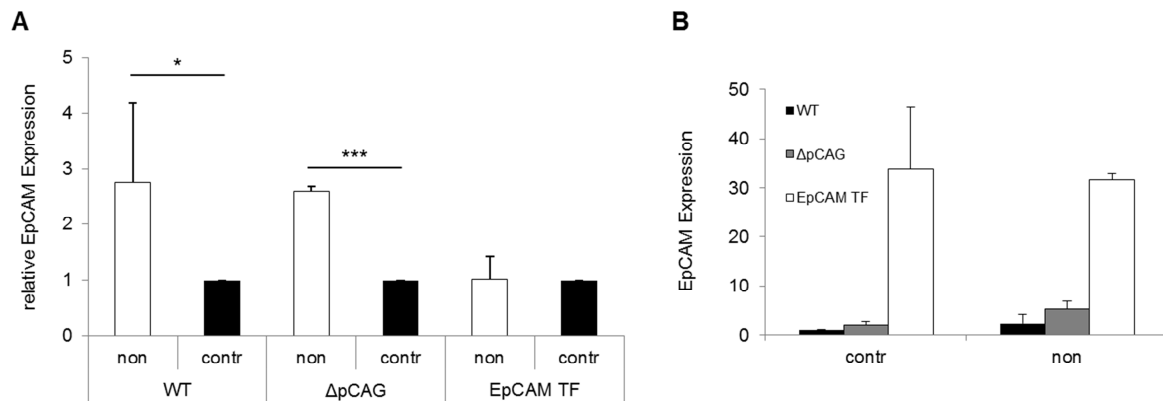
**Abbildung 4.21: Relative Oct3/4 Expression in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden *embryoid bodies*.**

EBs wurden aus den Zelllinien E14TG2 $\alpha$  WT, E14TG2 $\alpha$ - $\Delta pCAG$  und E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF generiert (siehe 3.1.5), nach dem Differenzierungsprozess in kontrahierende („contr“) und nicht-kontrahierende („non“) eingeteilt. Beide Untergruppen von EBs wurden verwendet, um wie unter Punkt 3.2.2 erklärt RNA zu isolieren und cDNA herzustellen. Diese wurde dann im LightCycler 480 mit Oct3/4-spezifischen Primern vermessen (siehe 3.2.3). In (A) konnte außer im Falle der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF in der Wildtyp- oder Kontrollzelllinie eine 14,8- bzw. 10,2-fach erhöhte Expression von Oct3/4 in den nicht-kontrahierenden EBs gezeigt werden. Die Auftragung in (B) stellte dar, dass die-kontrahierenden EBs der Wildtyp- und Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta pCAG$  eine stark erhöhte Expression von Oct3/4 im Vergleich zu kontrahierenden EBs aufwiesen. Die Expression von Oct3/4 in EBs der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF dagegen unterschied sich kaum. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei voneinander unabhängig ausgeführten Experimenten ermittelt.

Teil (B) der Abbildung gibt die Werte bei Normierung auf den Wert der kontrahierenden EBs der Wildtyp-Zelllinie wider. Diese Darstellung zeigt nicht nur eine höhere Expression von Oct3/4 in nicht-kontrahierenden EBs, sondern auch Unterschiede innerhalb dieser EBs. So war verglichen mit den EBs der E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF ES Zelllinie eine erhöhte Menge an Oct3/4 Transkript in EBs der Wildtyp- und Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta pCAG$  messbar.

Um potenzielle Unterschiede in der Expression von EpCAM aufzuklären, wurde die cDNA des vorangegangenen Versuchs verwendet und mit EpCAM-spezifischen Oligonukleotiden mittels quantitativer PCR vermessen. Die berechneten Resultate der Messungen sind in zwei verschiedenen Diagrammen, (A) und (B), auf unterschiedliche Art in Abbildung 4.22 zusammengefasst. Für Teil (A) der Abbildung wurden die Werte, wie bereits für Oct3/4 gezeigt (siehe Abbildung 4.21), auf die Werte der kontrahierenden EBs einer jeden Zelllinie normiert. Das Expressionsmuster

von EpCAM glich bis auf die Höhe der Expression exakt dem des Pluripotenzmarkers Oct3/4.

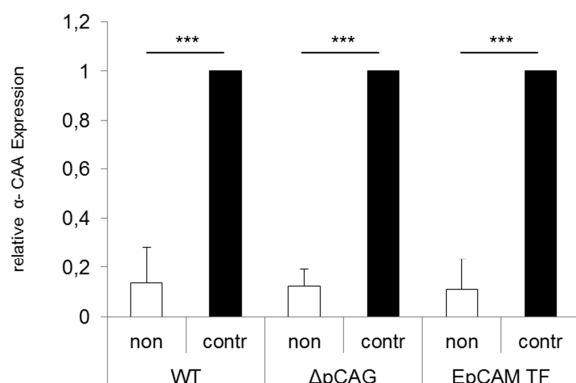


**Abbildung 4.22: Relative EpCAM Expression in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden *embryoid bodies*.**

EBs wurden aus den Zelllinien E14TG2 $\alpha$  WT, E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG und E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF generiert (siehe 3.1.5), nach dem Differenzierungsprozess in kontrahierende („contr“) und nicht-kontrahierende („non“) eingeteilt. Beide Untergruppen von EBs wurden verwendet, um wie unter Punkt 3.2.2 erklärt RNA zu isolieren und cDNA herzustellen. Diese wurde dann im LightCycler 480 mit EpCAM-spezifischen Primern vermessen (siehe 3.2.3). In **(A)** konnte außer im Falle der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF in der Wildtyp- oder Kontrollzelllinie eine 2,27- bzw. 2,56-fach erhöhte Expression von EpCAM in den nicht-kontrahierenden EBs gezeigt werden. Allerdings bewies die Auftragung in **(B)**, dass sowohl die kontrahierenden, wie auch die nicht-kontrahierenden EBs der Zelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF eine stark erhöhte Expression von EpCAM im Vergleich zu EBs von Wildtyp- und Kontrollzellen aufwiesen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei voneinander unabhängig ausgeführten Experimenten ermittelt.

Die Frage, warum im EpCAM überexprimierenden System keinerlei Unterschied zu erkennen war, konnte mit einer anderen Art der Auftragung in **(B)** beantwortet werden. Hierfür wurden die Werte nach „kontrahierend“ (contr) und „nicht-kontrahierend“ (non) sortiert und auf die Expression von EpCAM in kontrahierenden Wildtyp-Zellen normiert. Durch diese Berechnung konnte nun auch eine vergleichbar, sehr starke Überexpression von EpCAM in E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF Zellen aus kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs dargestellt werden. In beiden Typen von EBs war eine 6,0- bis 16,6-fach erhöhte Expression von EpCAM im Vergleich zu E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG Zellen zu beobachten (Abbildung 4.22 **(B)**).

Die Entwicklung fötaler Kardiomyozyten wird von einer Abfolge der Expression von Aktin-Isoformen begleitet (Driesen *et al.* 2009). Nach einer negativen Regulation von  $\alpha$ -SMA (*alpha smooth muscle actin*), kommt es erst zu einer verstärkten Expression von  $\alpha$ -SKA (*alpha skeletal actin*), bevor  $\alpha$ -CAA (*alpha cardiac actin*) in der Zelle überwiegt. Um die *in vitro* Generierung reifer Kardiomyozyten zu bestätigen, wurde die cDNA analysiert, die auch für die Untersuchung von Oct3/4 und EpCAM verwendet wurde. Mit  $\alpha$ -CAA-spezifischen Primern wurde diese im LightCycler 480 vermessen und die Expression mit der Software LightCycler® 480 SW 1.5 berechnet. Wieder wurden alle Werte der nicht-kontrahierenden (weiß) als Standard für die entsprechenden Expressionsstärken der kontrahierenden Zellen (schwarz) herangezogen.



**Abbildung 4.23:  $\alpha$ -CAA Expression in nicht-kontrahierenden im Vergleich zu kontrahierenden *embryoid bodies*.**

EBs wurden aus den Zelllinien E14TG2 $\alpha$  WT, E14TG2 $\alpha$ - $\Delta pCAG$  und E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF generiert (siehe 3.1.5), nach dem Differenzierungsprozess in kontrahierende („contr“) und nicht-kontrahierende („non“) eingeteilt. Beide Untergruppen von EBs wurden verwendet, um wie unter Punkt 3.2.2 erklärt RNA zu isolieren und cDNA herzustellen. Diese wurde dann im LightCycler 480 mit EpCAM-spezifischen Primern vermessen (siehe 3.2.3). Die Expression war in allen verwendeten Zelllinien in den nicht-kontrahierenden EBs um das 7,4- bis 9,1-fache reduziert. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus drei verschiedenen Versuchen berechnet.

Die Expressionsmuster von  $\alpha$ -CAA waren in allen drei untersuchten Zelllinien vergleichbar (siehe Abbildung 4.23): Verglichen mit nicht-kontrahierenden EBs war in den kontrahierenden ein Anstieg der  $\alpha$ -CAA mRNA Menge um den 7,4- bis 9,1 zu vermerken. Dies bestätigte zum einen die Annahme, dass eine Kontraktion in einem

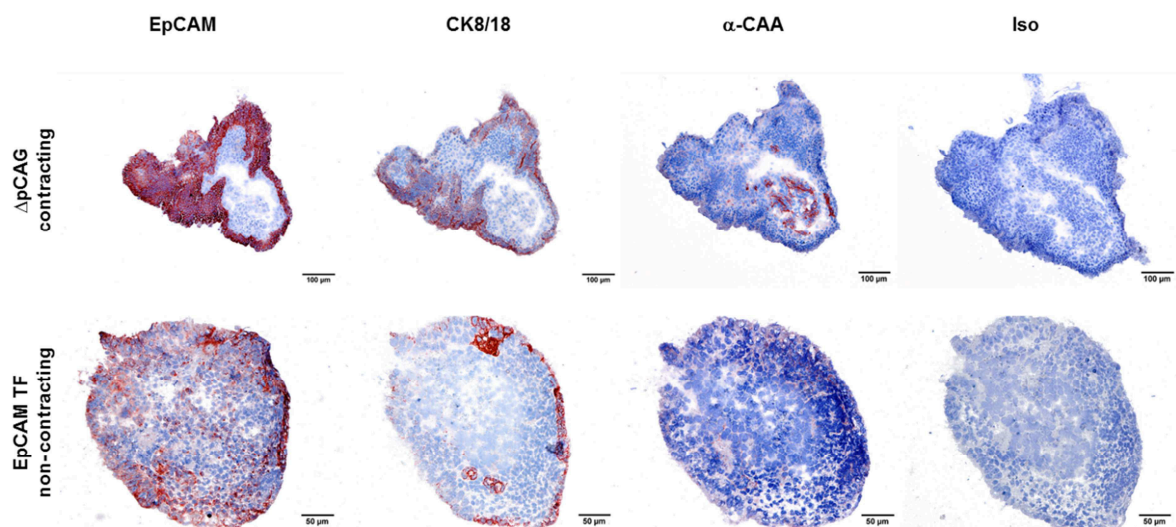
Zellverbund mit einer erhöhten Expression an  $\alpha$ -CAA korreliert, zum anderen, dass es sich bei diesen um Kardiomyozyten handelte.

#### **4.2.7 Immunhistochemische Untersuchungen der EpCAM, Zytokeratin 8/18 und $\alpha$ -CAA Expression in Abhängigkeit der Kontraktion von EBs**

Abbildung 4.10 führte eindrücklich die Regulation der Expression von EpCAM in EBs im Zuge der Differenzierung vor Augen. Die ubiquitäre Verteilung des Proteins innerhalb undifferenzierter EBs wich mit zunehmendem Grad der Differenzierung einer heterogenen Färbung. Dabei ummantelten ab dem zehnten Tag der Differenzierung EpCAM-exprimierende äußere Zellen des EBs die gänzlich negativen Zellen im Kern. Des Weiteren war eine basolaterale, Epithel-ähnliche Expression von EpCAM in den positiven Zellen des äußeren Saums von EBs zu sehen (Abbildung 4.11). Diese Schnitte und Färbungen wurden alle aus EBs gewonnen, die aus Zellen mit endogener EpCAM Expression generiert wurden. Anders sah es für die Präparate in Abbildung 4.24 aus: Hier wurden Schnitte eines nicht-kontrahierenden, EpCAM-überexprimierenden EBs mit Färbungen eines kontrahierenden EBs der Kontrollzelllinie verglichen.

Zuerst wurden EBs mittels *hanging drop*-Methode erzeugt, diese an Tag drei zur weiteren Differenzierung in *ultra-low attachment*-Platten transferiert und bis Tag 21 in diesen inkubiert. Nach dem Einbetten und Schockgefrieren der EBs wurden sie im Kryotom geschnitten und anschließend immunhistochemisch behandelt. Dabei wurden EpCAM-, CK8/18- und  $\alpha$ -CAA-gerichtete Antikörper verwendet, deren Spezifität mit Hilfe einer Isotypkontrolle bestätigt werden konnte. Abbildung 4.24, die im oberen Teil die Präparate einen repräsentativen kontrahierenden EB der Kontrollzelllinie, im unteren einen nicht-kontrahierenden EB der Überexpressionszelllinie E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF darstellt, zeigt von links nach rechts die Färbung für EpCAM, CK8/18,  $\alpha$ -CAA und zuletzt für die Isotypkontrolle (Iso).





**Abbildung 4.24: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM, CK8/18 und α-CAA in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs.**

Nach Generierung der EBs (siehe 3.1.5) wurden sie an Tag 21 des Differenzierungsprozesses aus den *ultra-low attachment*-Platten geerntet und schockgefroren. Wie in Abschnitt 3.3 erläutert wurden die Proben geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Diese Präparate wurden mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und analysiert. Verwendet wurden zum einen ein kontrahierender EB der Kontrollzelllinie, zum andern ein nicht-kontrahierender EB der Überexpressionszelllinie E14TG2α-EpCAM-TF. Anfärbt wurden die Proteine EpCAM, CK8/18 und α-CAA. Die Isotypkontrolle (als „Iso“ bezeichnet) stellt eine spezifische Bindung der Antikörper sicher. Gezeigt sind repräsentative Beispiele beider Zelllinien.

Die EpCAM Färbung der Kontrolle (oben) ähnelte, mit einem absolut negativen Kern und einem stark positiven Rand, stark der Struktur in Abbildung 4.10 an Tag 21. Die breitere Umrandung beruht auf einer anderen Schnittebene des EB, die sich näher an den Polen der kugelähnlichen Struktur befand und somit mehr Zellen des äußeren Randes als des Kerns aufwies. Die bereits erwähnte Hypothese des epithelialen Charakters der äußeren Zellen wurde mit dem nächsten Präparat des Serienschnitts der Kontrolle bekräftigt. Die Färbung mit CK8/18, beides Marker für einfaches Epithel (Damonte *et al.* 2007) war deckungsgleich mit der EpCAM Färbung. Die CK8/18-Positivität der EpCAM-exprimierenden Zellen des äußeren Saums von EBs bestätigt den epithelialen Phänotyp dieser Zellen. Der Vergleich der EpCAM Färbung des EBs der Überexpressionszelllinie zeigte auch nach 21-tägiger Differenzierung eine heterogene, aber ubiquitäre Expression von EpCAM. Die Expression von CK8/18 blieb auch in diesem EB auf die Zellen des äußeren Saums beschränkt. Die

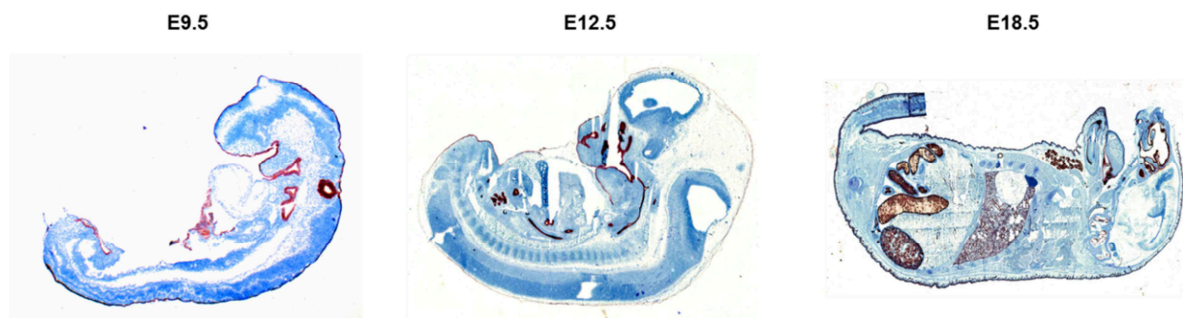
Anfärbung von  $\alpha$ -CAA wies einen Kern positiver Zellen, die ausnahmslos EpCAM-negativ waren, im kontrahierenden EB auf, welcher in dem nicht-kontrahierenden EB gänzlich fehlte (Abbildung 4.23).

### 4.3 EpCAM Expression in muriner Embryonalentwicklung

Bisher wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Expression von EpCAM und deren Auswirkungen im Rahmen einer *in vitro* Differenzierung von embryonalen murinen Stammzellen als EBs beschrieben. Obschon EBs ihre Limitationen insbesondere in Bezug auf die Morphologie von Embryonen besitzen, rekapitulieren sie dennoch eine Vielzahl von Prozessen bezüglich der Geschwindigkeit der Differenzierungsereignisse und der Expression bestimmter, spezifischer Marker (Sajini *et al.* 2012). Die Folgen der Differenzierung auf endogenes EpCAM zum einen und die Auswirkung einer exogenen Expression des Proteins während dieses Prozesses zum anderen, wurden in den vorhergehenden Kapiteln (siehe 4.1 und 4.2) ausführlich erläutert. Nagao *et al.* publizierten im Jahr 2009 eine essentielle Rolle EpCAMs in der Embryonalentwicklung. In ihrer Arbeit demonstrierten sie, dass homozygot EpCAM-defiziente Mäuse im Entwicklungsstadium E12.5 aufgrund eines Defekts des Uterus starben. Heterozygote Mäuse waren lebensfähig, fertil und wiesen keinerlei Anomalitäten auf (Nagao *et al.* 2009). In der Arbeit einer anderen Gruppe führte die Generierung von homozygot EpCAM-defizienten Mäusen zu Tieren, die kurz nach der Geburt an einem Darmdefekt starben (Guerra *et al.* 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Assoziation der Expression von EpCAM mit dem pluripotenten Phänotyp von ES Zellen und mit differenzierten Epithelzellen beschrieben. Im Gegenzug fehlte EpCAM in mesodermal differenzierten Zellen, i.e. Kardiomyozyten, komplett und eine erzwungene Expression von EpCAM hemmte diese Differenzierung. Zur Überprüfung der potentiellen Assoziation von EpCAM mit einer endodermalen Differenzierung wurde die Expression *ex vivo* in frühen Stadien der Embryonalentwicklung analysiert. Hierfür wurden aus dem Uterus von CBL Wildtyp-Mäusen Embryos der Stadien E9.5, E12.5 und E18.5 von Dr. Matthias Kieslinger isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe 2.6). Die Embryos wurden in einer PBS-Lösung gewaschen, mit „TissueTek“ in

Kryomoldschalen eingebettet, schockgefroren und unter Verwendung eines Kryotoms in 4µm dicken Schnitten auf Objektträger aufgebracht. Wie in Abschnitt 3.3 ausführlich geschildert, wurden diese Präparate mit einem EpCAM-spezifischen Primärantikörper behandelt.



**Abbildung 4.25: EpCAM Expression in Schnitten von murinen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien.**

Die Embryos der Entwicklungsstufen E9.5, E12.5 und E18.5 wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Kieslinger isoliert und zur Verfügung gestellt. Die Embryos wurden in PBS gewaschen und gemäß 3.3 in „TissueTek“ schockgefroren. Die angefertigten Schnitte wurden mit EpCAM-spezifischen Antikörpern behandelt. Die geringe Expression von EpCAM im frühen E9.5 Stadium wird in der weiteren Entwicklung verstärkt, bevor sie im pränatalen Stadium E18.5 in einigen Organen stark zu erkennen ist.

Abbildung 4.25, in der jeweils ein Schnitt der oben erwähnten Entwicklungsstufen E9.5, E12.5 und E18.5 dargestellt ist, soll ausschließlich einen ersten Überblick über die Expression von EpCAM in der Entwicklung der Maus geben. Die Embryos wurden in chronologischer Abfolge und Rückenlage in der Abbildung präsentiert. Im ersten uns vorliegenden Entwicklungsstadium E9.5 ist eine den gesamten Embryo umfassende Zellschicht zu erkennen, die stark EpCAM-positiv ist. Dies ähnelte interessanterweise sehr der epithelialen Umrandung der EBs nach 21-tägiger Differenzierung (siehe Abbildung 4.10). Neben den Zellen der äußeren Schicht konnten weiterhin Einschlüsse und Färbungen im mittleren Bereich des Embryos beobachtet werden, die der Ohranlage (Otic pit) und zukünftigen Bereichen des Oro- und Hypopharynx entsprechen. Im Embryo E12.5 waren die Hals-Kopf-Strukturen noch immer zu erkennen, während noch weitere hinzukamen. Die EpCAM Expression des bereits lebensfähigen Embryos (Stufe E18.5) dagegen war wieder weitaus höher, da viele Organe und Epithelien eine EpCAM Färbung zeigten. Die

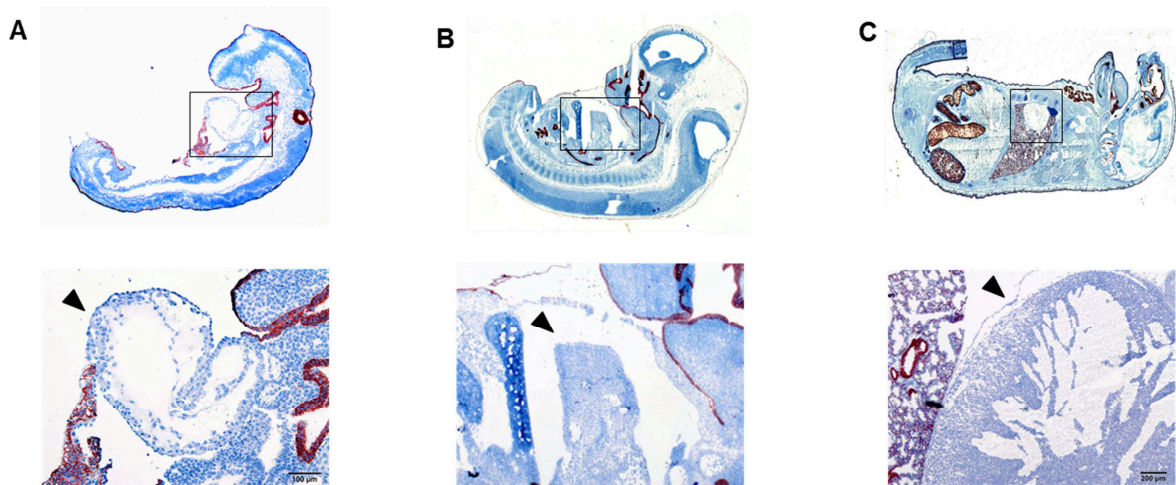
Schwankungen der Expression in den drei Embryos zeigten eine Regulation und Plastizität von EpCAM in verschiedenen Geweben.

Die detaillierte Übersicht der verschiedenen Bereiche, Organe und deren Anlagen werden im Folgenden aufgeführt und erläutert (siehe Abbildung 4.27, Abbildung 4.28, Abbildung 4.29).

#### **4.3.1 Expression von EpCAM in Herzanlagen und dem fötalen murinen Herz**

Die Überexpression von EpCAM in Verbindung mit einer Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen offenbarte, in Abschnitt 4.2.5 näher erklärt, einen hemmenden Einfluss des Proteins auf die Entwicklung zu Kardiomyozyten. Im Säugerorganismus sind diese Herzmuskelvorläuferzellen mit der extrazellulären Matrix des Herzens verbunden und sorgen so für die Kontraktion des gesamten Organs (Harvey and Leinwand 2011).

Aus diesem Grund wurde damit begonnen die Herzanlagen der Embryonen anhand der bereits gezeigten EpCAM Färbungen näher zu untersuchen. Dazu wurden die entsprechenden Ausschnitte der Präparate vergrößert dargestellt. **(A)**, **(B)** und **(C)** der Abbildung 4.26 zeigen den gesamten Embryo (oben) mit dem dazugehörigen Teilbereich (unten). Der in diesen Abschnitten abgebildete Pfeil markiert dabei das analysierte Gewebe. Der vergrößerte Ausschnitt der Herzanlage in **(A)** zeigt, dass die Zellen dieses Gewebes EpCAM-negativ sind. Auch in den beiden weiteren Präparaten der Entwicklungsstadien E12.5 und E18.5 war keinerlei Färbung der zu untersuchenden der Herzanlage **(B)** bzw. des adulten Organs **(C)** zu erkennen. Die Anfärbung EpCAM-positiver Zellen in angrenzenden Geweben aller Stadien ist eine interne Kontrolle für die durchgeführte Färbung.



**Abbildung 4.26: EpCAM Expression in Herzanlagen und dem entwickelten Herz muriner Embryonen.**

Die von Dr. Matthias Kieslinger zur Verfügung gestellten Mausembryonen der Embryonalstadien E9.5 (A), E12.5 (B) und E18.5 (C) wurden schockgefroren, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen (siehe 3.3). Die Präparate wurden mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper gefärbt und mikroskopisch analysiert. Es war keine Färbung der Herzanlagen oder des ausgereiften Herzens (in der Abbildung mit einem schwarzen Kasten bzw. einem Pfeil markiert) zu erkennen. Gezeigt sind sowohl Aufnahmen des ganzen Embryos, wie auch vergrößerte Ausschnitte der Herzanlagen und des muren Herzens.

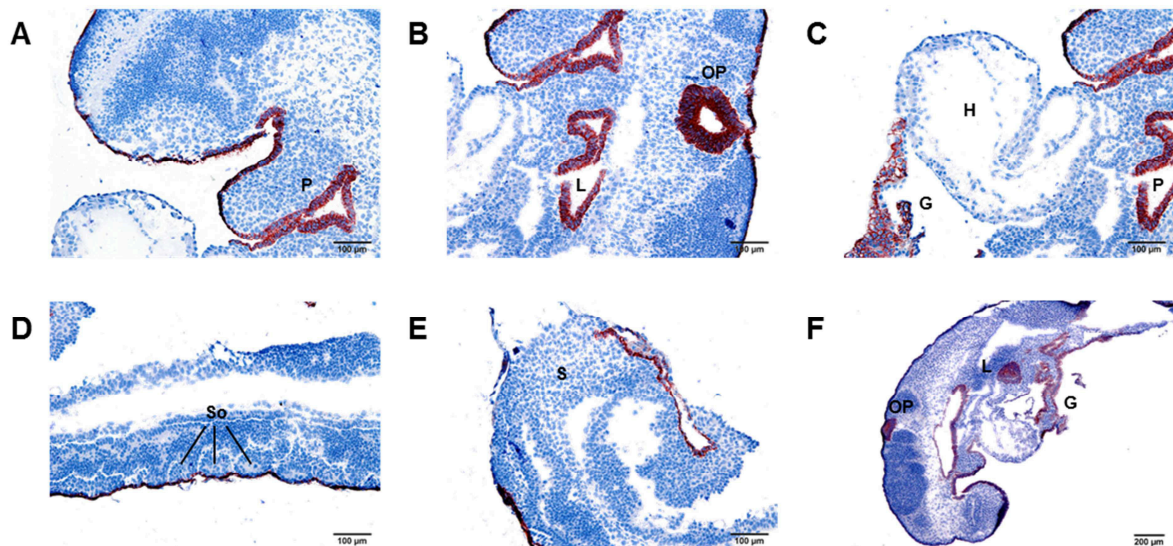
#### 4.3.2 Expressionsmuster von EpCAM in einzelnen Entwicklungsstufen der Mausembryos

Wie am Anfang des Kapitels angesprochen, werden in den folgenden Abbildungen Ausschnitte der Embryos aller erwähnten Entwicklungsstadien detailliert gezeigt. Wieder wurden die von Dr. Matthias Kieslinger bereitgestellten und in unserem Labor geschnittenen Embryos mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper inkubiert (siehe 3.3).

Die erste Abbildung (Abbildung 4.27) zeigt Teilbereiche des Embryos der Stufe E9.5. Anhand dieser Vergrößerungen ließen sich deutlich die EpCAM-positiven Gewebe, wie beispielsweise die Umrandung des gesamten fötalen Organismus oder des späteren Pharynx (A, B) erkennen. Auch die Auskleidung der Anlagen des Larynx (B), des Ohrs (B) oder des Gastrointestinaltrakts (C, F) wiesen eine hohe Expression an EpCAM auf. Der Schwanz des Embryos (E) und die Somiten (D) waren negativ für EpCAM. Die Untersuchung eines Präparats aus einer anderen Schnittebene (F)



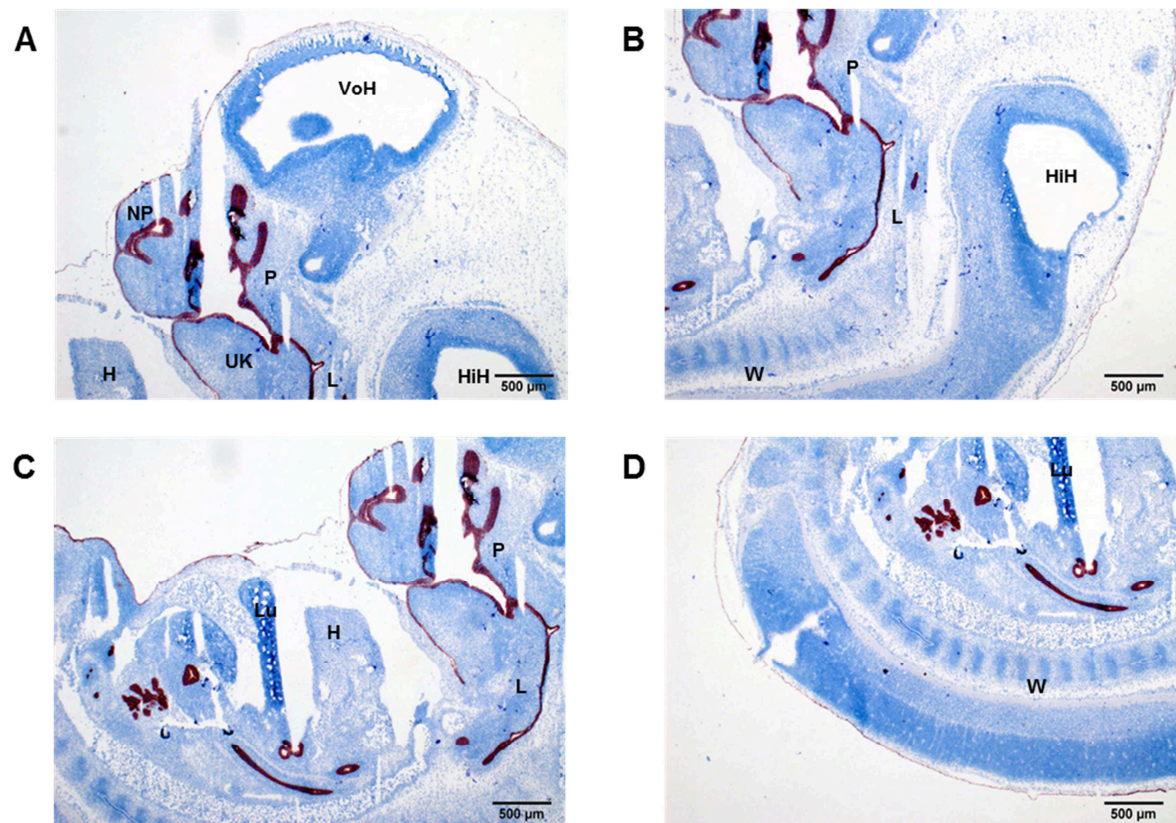
bestätigte die obengenannten Färbemuster und wies zudem auf die starke Färbung von EpCAM in der fötalen Leber der Maus, die damit die einzige sichtbare Organanlage darstellte, die in diesem Stadium EpCAM exprimierte (mit „L“ in Abbildung 4.26 (F) markiert).



**Abbildung 4.27: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E9.5.**

Mausembryos des Stadiums E9.5 wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Kieslinger bereitgestellt, die gemäß Abschnitt 3.3 bearbeitet wurden. Die Färbung erfolgte mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper. Dargestellt sind in (A)-(F) verschiedene Ausschnitte der Präparate. EpCAM wird in der äußeren Umrandung des Embryos, Anlagen des Pharynx, des Larynx, des späteren Ohrs, genannt „otic pit“, des Gastrointestinaltrakts und der embryonalen Leber exprimiert. Zellen des Herzens, der Somiten und des Schwanzes wurden nicht angefärbt. P, Pharynx; L, Larynx; OP, „otic pit“; G, Gastrointestinaltrakt; L, Leber; H, Herz; So, Somiten; S, Schwanz.

Vier vergrößerte Ausschnitte des Organismus im Embryonalstadium E12.5 sind in Abbildung 4.28 zu sehen. Die Vorstufen des Gehirns, das Vorder-, Hinter- und Mittelhirn, waren EpCAM-negativ (A, B). Letzteres wurde mit der Färbung einer anderen Schnittebene belegt (Daten nicht gezeigt). Auch das Herz, die Lunge und die Wirbelsäule waren frei von jeglicher Färbung (C, D). Die Auskleidungen des sich entwickelnden Larynx, und (Naso-) Pharynx (A, B, C) wiesen eine hohe Menge an EpCAM auf. Des Weiteren waren Strukturen im Abdomen des Embryos, sehr wahrscheinlich Anlagen des Darms EpCAM positiv (C, D).



**Abbildung 4.28: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E12.5.**

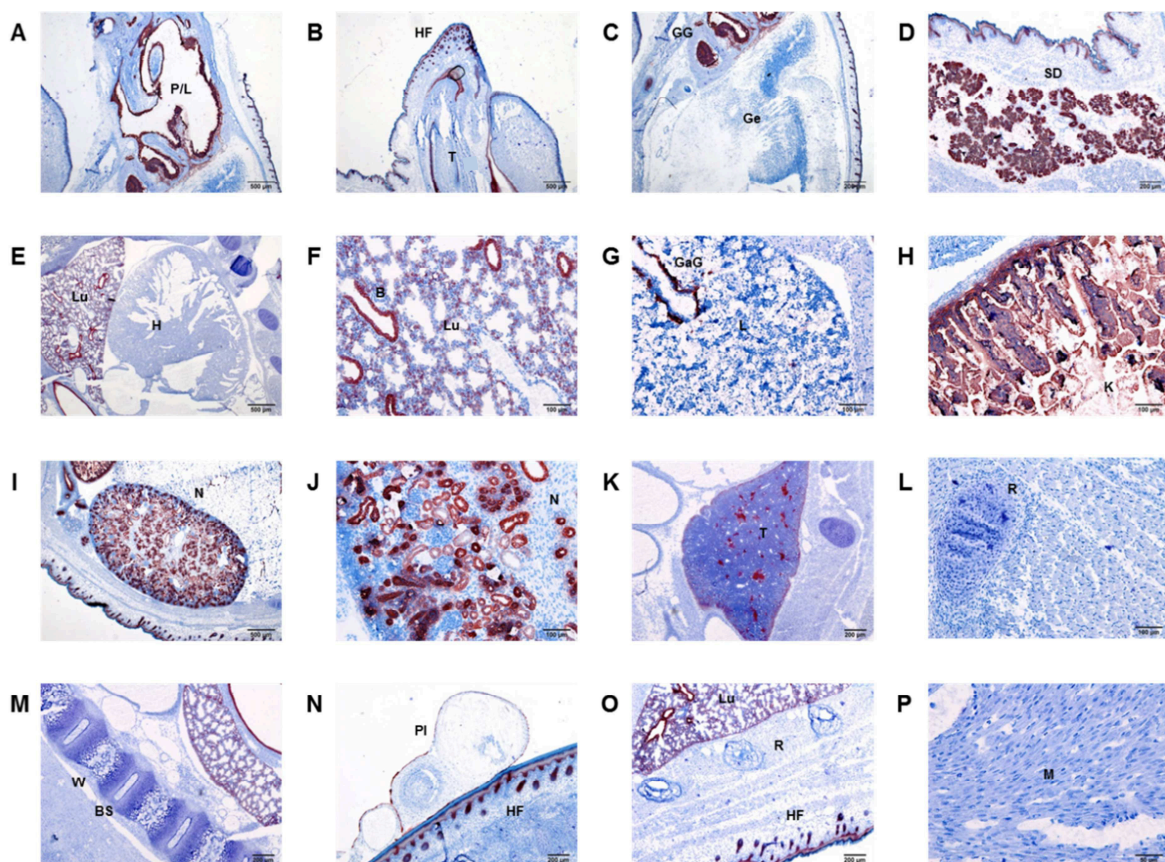
E12.5 Embryos wurden von Dr. Matthias Kieslinger aus einem Maus Uterus isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Embryos wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren, im Kryotom geschnitten und mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper angefärbt. EpCAM wird in Zellen der Pharynxanlagen und des späteren Larynx exprimiert. Negativ dagegen sind das Vorder- und Hinterhirn, das Herz, die Lunge und die Wirbelsäule. NP, Nasopharynx; P, Pharynx; L, Larynx; VoH, Vorderhirn; HiH, Hinterhirn; UK, Unterkiefer; H, Herz; Lu, Lunge; W, Wirbelsäule.

Mit der dritten Abbildung (Abbildung 4.29) wird der pränatale, fötale Organismus des Stadiums E18.5 im Hinblick auf die Expression von EpCAM in Geweben und Organen näher untersucht. Die *de novo* Expression von EpCAM konnte in den vergrößerten Teilbereichen des Embryos sehr klar nachvollzogen werden. Des Weiteren konnten die Expression von EpCAM in Geweben oder Organen in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Neben den Geweben der Gruppe eins, in welchen die Expression unverändert blieb, gab es Gruppe zwei mit einer *de novo* Expression des Proteins. In Gruppe drei wiederum waren die Gewebe, die einer



negativen Regulation unterworfen worden waren und in der Folge keine EpCAM Expression mehr aufwiesen.

Wie schon in den anderen beiden Entwicklungsstufen waren die epithelialen Auskleidungen des Larynx und Pharynx (**A**) im lebensfähigen Tier stark EpCAM-positiv und waren folglich der ersten Gruppe zuzuordnen. Dies traf ebenfalls auf das Epithel der Gehörgänge zu (**C**). Auch kam es zu keiner *de novo* Expression des EpCAM Proteins im Gehirn (**C**), dem Herz und dessen Muskeln (**E**, **P**) und der Wirbelsäule mit Wirbeln und Bandscheiben (**M**).



**Abbildung 4.29: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM in Mausembryos der Embryonalstufe E18.5.**

Mausembryos wurden kurz vor der Geburt (E18.5) von Dr. Matthias Kieslinger isoliert und bereitgestellt. Diese wurden schockgefroren und geschnitten. Die fertigen Präparate wurden mit einem EpCAM-spezifischen Antikörper angefärbt. In (**A**)- (**P**) sind Ausschnitte von Geweben oder Organen der pränatalen Maus zu sehen. Positiv für EpCAM sind die Auskleidung des Pharynx, des Larynx und der Gehörgänge(**A- C**), die Schilddrüse (**D**), Teile der Lunge und der Leber (**E- G**), die Krypten des Kolons (**H**), Teile der Niere (**I, J**), Blutgefäße des Thymus (**K**) und Haarfollikel (**B, N, O**). Keine Färbung weisen dagegen das Gehirn (**C**), das Herz (**E**), Teile der Leber und der Niere (**G, I, J**), das Gewebe des Thymus (**K**), die Rippen (**L, O**), Wirbel (**M**), Bandscheiben (**M**) und Muskelgewebe (**P**) auf. Lu, Lunge; H, Herz;



B, Bronchiolus; GaG, Gallengang; K, Kolon, N, Niere; T, Thymus; R, Rippe; W, Wirbel; BS, Bandscheibe, HF, Haarfollikel; M, Muskelgewebe.

Gewebe der zweiten Gruppe mit einer *de novo* Expression von EpCAM waren, abgesehen von der Schilddrüse (**D**), die Lunge mit Bronchiolen (**E**, **F**), die Krypten des Kolon (**H**), Zellen des Thymus (**K**), Teile der Niere (**I**, **J**) und Haarfollikel (**B**, **N**, **O**). Verloren hatte die Expression von EpCAM aufgrund negativer Regulation die Leber (**G**). Allein Gallengänge konnten als EpCAM-positiv erkannt werden. Ein Teil der Plazenta blieb an der Haut des Embryos haften und zeigte eine leichte EpCAM Färbung der Trophoblasten der Hülle (**N**).

#### **4.4 Regulation von Differenzierungsmarkern in Folge von EpCAM Überexpression und Differenzierung**

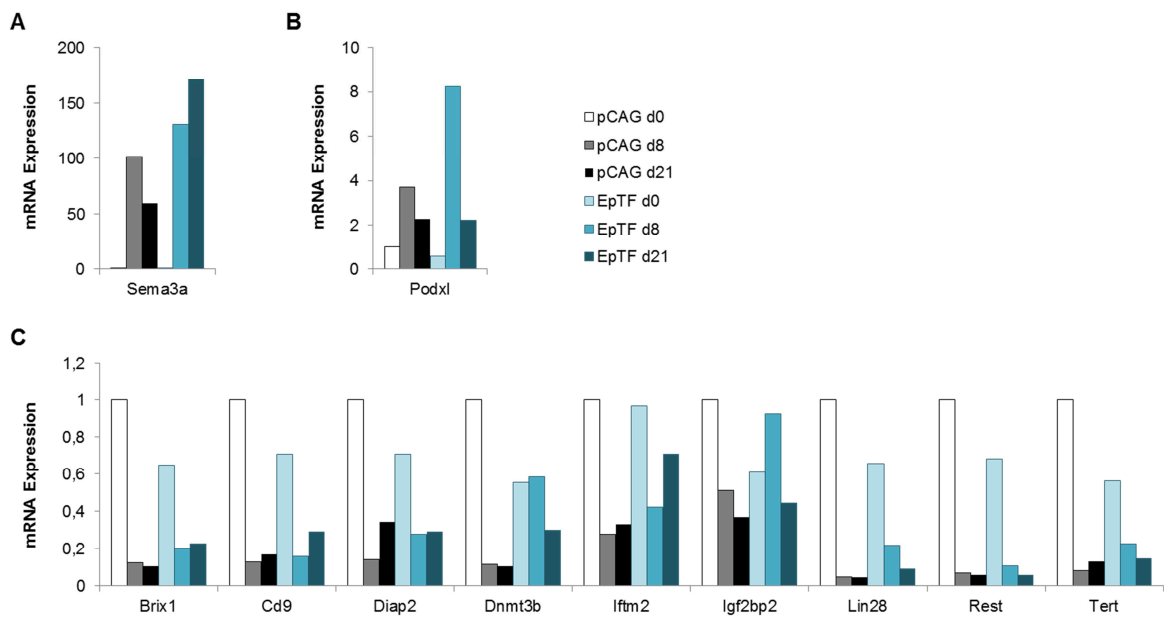
In der vorliegenden Arbeit sollte die Differenzierung von pluripotenten murinen embryonalen Stammzellen hinsichtlich EpCAM und dessen Einfluss analysiert werden. Der Phänotyp, der der Hemmung der Differenzierung zu Kardiomyozyten gab eine Richtung der Entwicklung vor. Eine unverwechselbare Eigenschaft pluripotenter Zellen ist es in Zellen aller drei Keimblätter, des Endo-, Meso- und Ektoderms, differenzieren zu können. Diese Zellen bilden den Ursprung aller Körperzellen und werden, unter anderem durch transkriptionelle, epigenetische und translationale Regulationen, fortlaufend differenziert und spezialisiert. Am Ende dieses Prozesses steht die mature somatische Zelle. Den Ursprung der Herzmuskel-Vorläuferzellen stellen mesodermale Zellen dar, die hierfür vier Differenzierungsstufen durchlaufen müssen (Rajala *et al.* 2011).

Die *hanging drop*-Methode, die in dieser Arbeit zur Generierung der EBs verwendet wurde, erlaubt es den Zellen allerdings in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Mogi *et al.* 2009). Dies warf unweigerlich die Frage auf, ob die Differenzierung der Zellen innerhalb eines EpCAM-überexprimierenden EBs auch die Entwicklung anderer Keimblätter und Differenzierungsstufen beeinflusste.

Deshalb wurde ein cDNA Differenzierungsarray der Firma Roche ("RealTime ready Custom"-Array) entworfen und durchgeführt. Untersucht wurden Zellen verschiedener

Differenzierungsstufen der E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF und der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG. Hierfür wurden die pluripotenten Zellen geerntet, in Einzelsuspension mit Differenzierungsmedium auf  $2,5 \cdot 10^3$  Zellen/ml verdünnt und in Tropfen ausplattiert (siehe 3.1.5). Nach drei Tagen wurden die gebildeten EBs in *ultra-low attachment*-Platten überführt und weitere vier Tage bei 37°C inkubiert, bevor sie in Gelatine-beschichtete Multiwellplatten transferiert wurden. Es wurden Zellen und EBs an den Tagen null bzw. acht und einundzwanzig (d0, d8, d21) geerntet, deren RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.2), die anschließend gemäß den Angaben des Herstellers in die qPCR-Reaktion des Differenzierungsarrays eingesetzt wurde. Das Protokoll dieser Messung im LightCycler480 ist in Tabelle 3.3 aufgelistet (siehe 3.2.4). Mit dem Array wurde nicht nur die Expression von Stammzell-spezifischen Genen, von Pluripotenz-erhaltenden Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, sondern auch von Zytokinen und Wachstumsfaktoren untersucht. Des Weiteren wurden Marker analysiert, die eine Rolle in der Differenzierung von Trophoblasten, Knochen, Blut und Muskeln spielen. Auch auf mesodermale, kardiomyozitäre, endotheliale, endodermale und Pankreas-spezifische Marker konnte die Auswirkung von Differenzierung und exogener EpCAM Expression untersucht werden. Mit dem Array war es ebenfalls möglich die Expression verschiedener neuronaler, unterschiedlicher Stammzell-spezifischer Differenzierungs- und Keimblattmarker und zweier Keimzellmarker zu beobachten.

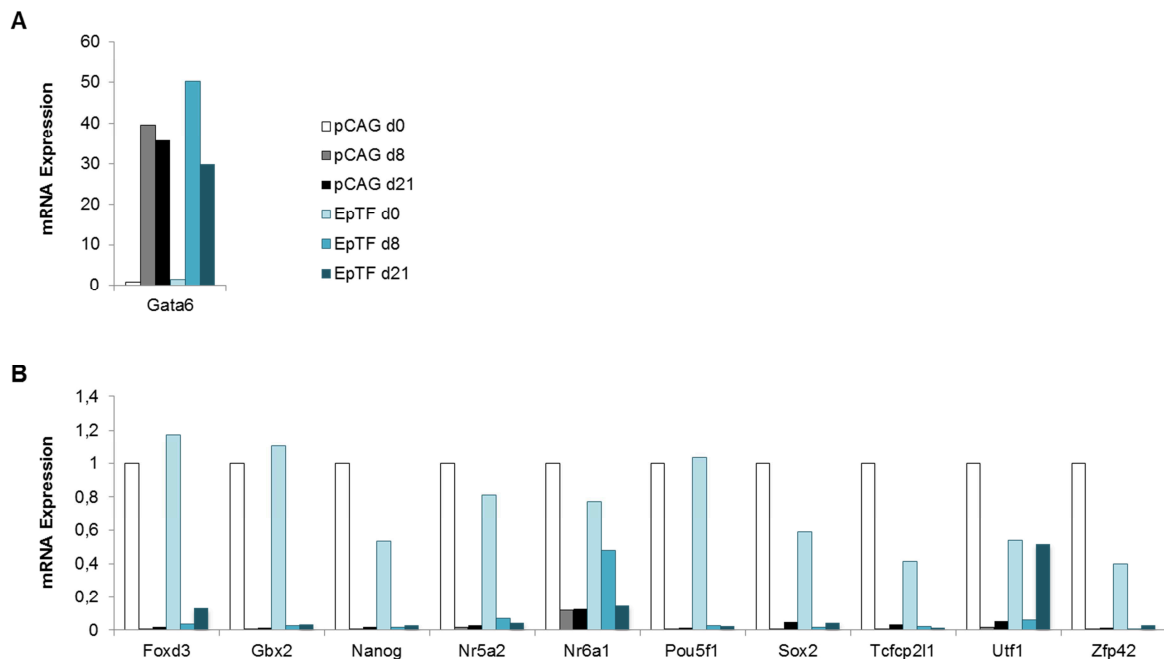
Die Ergebnisse der Kontrollzelllinie E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG sind in allen kommenden Abbildungen in Graustufen, die der Überexpressionszelllinie in verschiedenen Blautönen chronologisch dargestellt. Normiert wurden alle Werte auf den jeweiligen Messwert der pluripotenten Zellen der Kontrollzelllinie an Tag null (d0). Die Aufteilung der Gene auf teils unterschiedliche Diagramme innerhalb einer Abbildung resultierte aus der Expressionsstärke. Die Namen der Gene sind der Tabelle 2.9 zu entnehmen. In Abbildung 4.30 sind die Messergebnisse Stammzell-spezifischer Gene abgebildet. Trotz geringer Unterschiede in der Höhe der Expression, war keine Regulation der Gene durch EpCAM festzustellen. Die Expressionsmuster der EpCAM-überexprimierenden Zellen war dem der Kontrollzellen sehr ähnlich. Am Beispiel von Gen *Rest* oder *Lin28* bedeutete das eine rasche Abnahme der Expression an Tag 3 und ein Stagnieren des Werts bis Tag 21.



**Abbildung 4.30: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation Stammzell-spezifischer Genen.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG bezeichnet) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A), (B) und (C) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

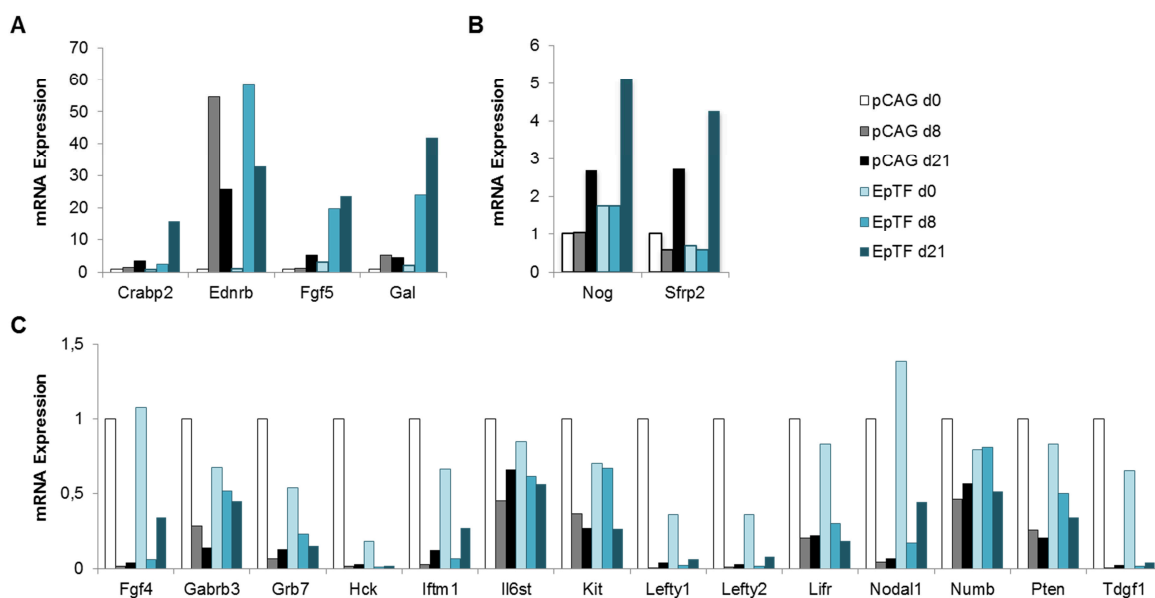
Dies war auch für die meisten Pluripotenz-erhaltenden Transkriptionsfaktoren in Abbildung 4.31 zu erkennen. Lediglich die Gene Nr6a1 und Utf1 in (B) wiesen bezüglich EpCAM Unterschiede in der Expression auf. Im Gegensatz zur Kontrolle wurde beispielsweise Utf1 an Tag 21 in den E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF Zellen reexprimiert.



**Abbildung 4.31: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Pluripotenzerhaltenden Transkriptionsfaktoren.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) und (B) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

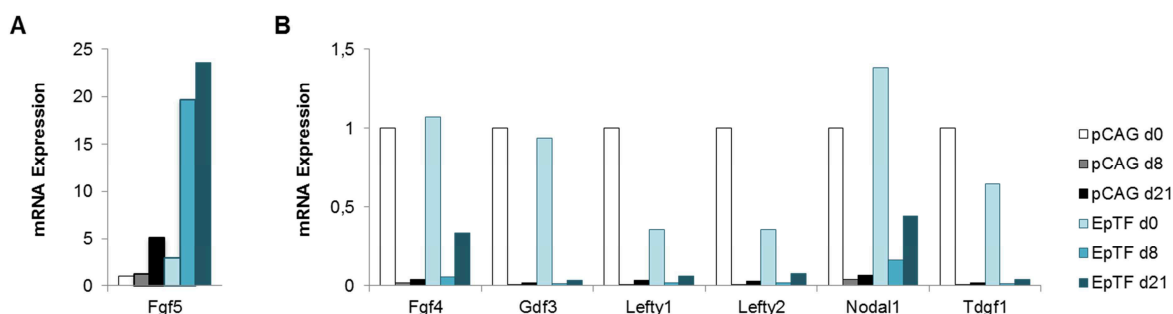
Die Analyse potentieller Expressionsänderungen von Signalmolekülen mit Funktion in der Pluripotenzerhaltung (siehe Abbildung 4.32) ergab keinerlei Regulationen in Folge des exogenen EpCAM. Nur die Menge an Transkripten war in den Zellen mit exogenem EpCAM teilweise beeinflusst, sodass eine verstärkte Expression der Gene Fgf5, Gal und Gabrb3 in diesen Zellen an Tag acht um das 16,3- bzw. 4,7- oder 1,8-fache und Tag 21 um das 4,6- bzw. 9,7- oder 3,2-fache zu vermerken war.



**Abbildung 4.32: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Signalmolekülen, die zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz dienen.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A), (B) und (C) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

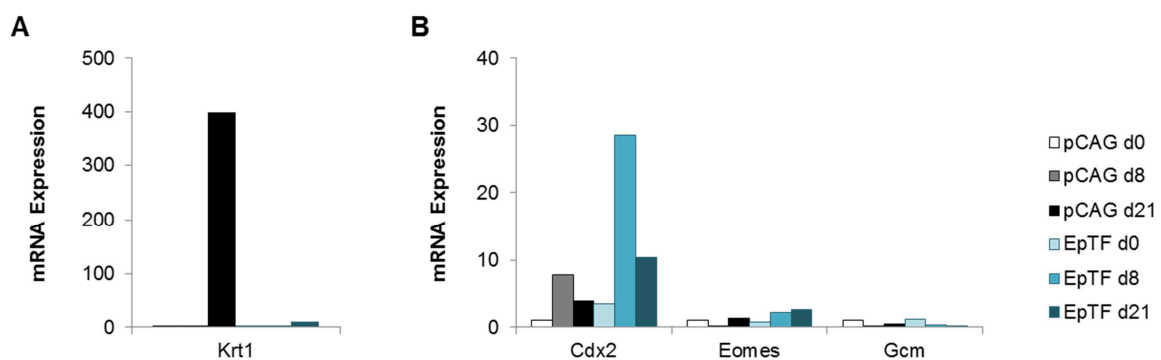
Auswirkungen der EpCAM Überexpression auf Zytokine und Wachstumsfaktoren war in Abbildung 4.33 ausschließlich für Fgf5 (siehe auch Abbildung 4.31), Fgf4 und Nodal1 erkennbar. Letztere waren, anders als in den Zellen der Kontrolle, an Tag 21 stärker exprimiert.



**Abbildung 4.33: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) und (B) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Die Analyse des Differenzierungsarrays ergab außerdem eine negative Regulation des Trophoblastmarkers Krt1 an Tag 21 in Zellen mit exogenem EpCAM (siehe Abbildung 4.34). Der Trophoblast, bestehend aus mehreren verschiedenen Zelltypen, ist äußerst wichtig für die Entwicklung da er die äußere Hülle der Blastozyste darstellt und unter anderem die Nährstoffübertragung an den Fötus übernimmt (Cross *et al.* 2002, Cross 2005). Die Expression der drei anderen untersuchten, Trophoblast-spezifischen Gene, Cdx2, Eomes und Gcm, war unverändert.

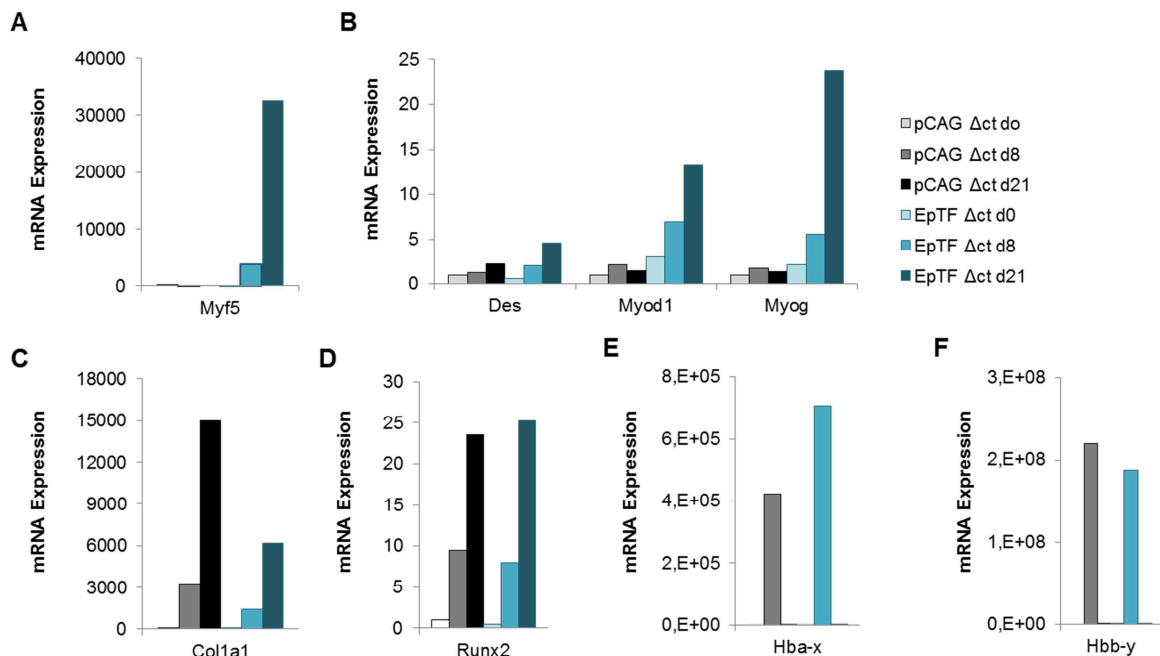


**Abbildung 4.34: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Trophoblast Markern.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) und (B) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Abbildung 4.35 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Genen, die in verschiedenen mesodermalen Geweben, wie Muskel (A, B), Knochen (C, D) und Blut (E, F) eine Rolle spielen. Während die Marker mit einer Funktion in der Muskeldifferenzierung in den EpCAM-exprimierenden Zellen an Tag 21 eine sehr

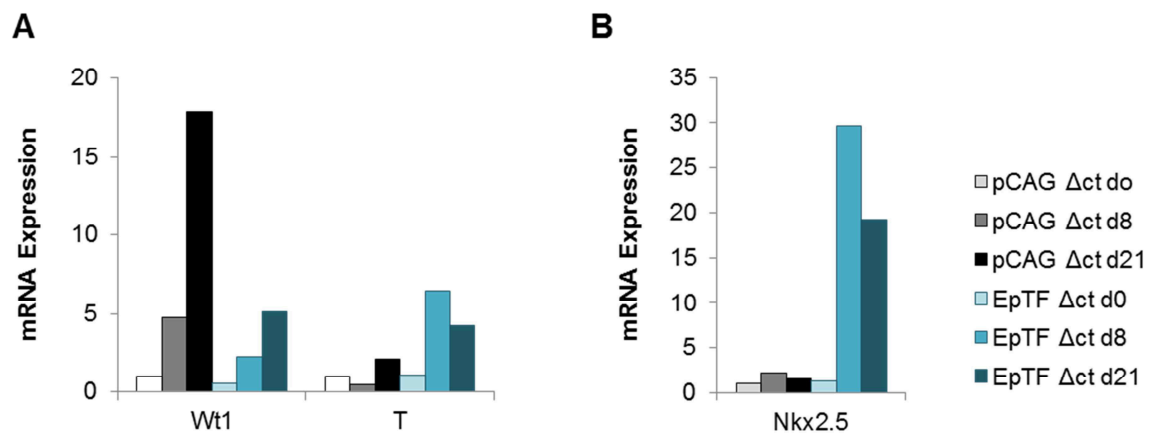
starke Erhöhung zeigten, war keine Modifikation des Expressionsmusters für diejenigen der Knochen- und Blutentwicklung wahrzunehmen.



**Abbildung 4.35: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von Genen exprimiert in mesodermalen Geweben.**

Die Zelllinien E14TG2α-EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2α-ΔpCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche ausgeführt. Dabei wurden Genen analysiert, die in der Muskel- (A, B) und Knochenentwicklung (C, D), sowie im Blut (E, F) eine wichtige Funktion haben. Die Messung wurde einmal durchgeführt.

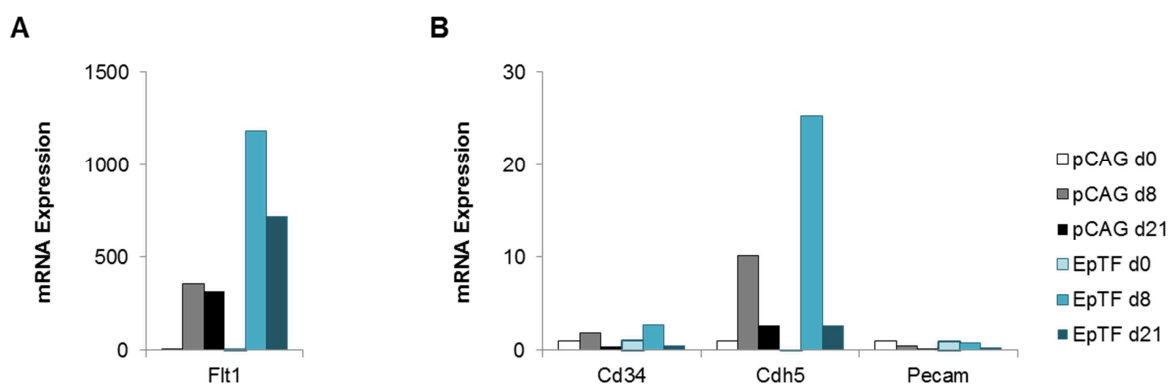
Diese Unterschiede bei Markern desselben Keimblatts waren auch in Teil (A) der folgenden Abbildung (Abbildung 4.36) zu sehen. Im Falle des Gens *Wt1* war der Expressionstrend zwar in beiden untersuchten Zelllinien derselbe, jedoch war die Expression an Tag 21 in der Kontrollzelllinie deutlich erhöht. Für den mesodermalen Marker *T* lag die Situation umgedreht vor. Dagegen zeigte das Kardiomyozyten-spezifische Gen in (B), *Nkx2.5*, dasselbe Expressionsmuster. Die Expression in differenzierten E14TG2α-EpCAM-TF Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen war stark angehoben.



**Abbildung 4.36: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von mesodermalen und kardiomyozitären Markern.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) und (B) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Die in Abbildung 4.37 dargestellten Ergebnisse der Messung endothelialer Marker zeigt hinsichtlich der EpCAM Überexpression für kein Gen einen unterschiedlichen Verlauf der Expression. Nur ihre Stärke ist in Flt1 und Cdh5 verändert.



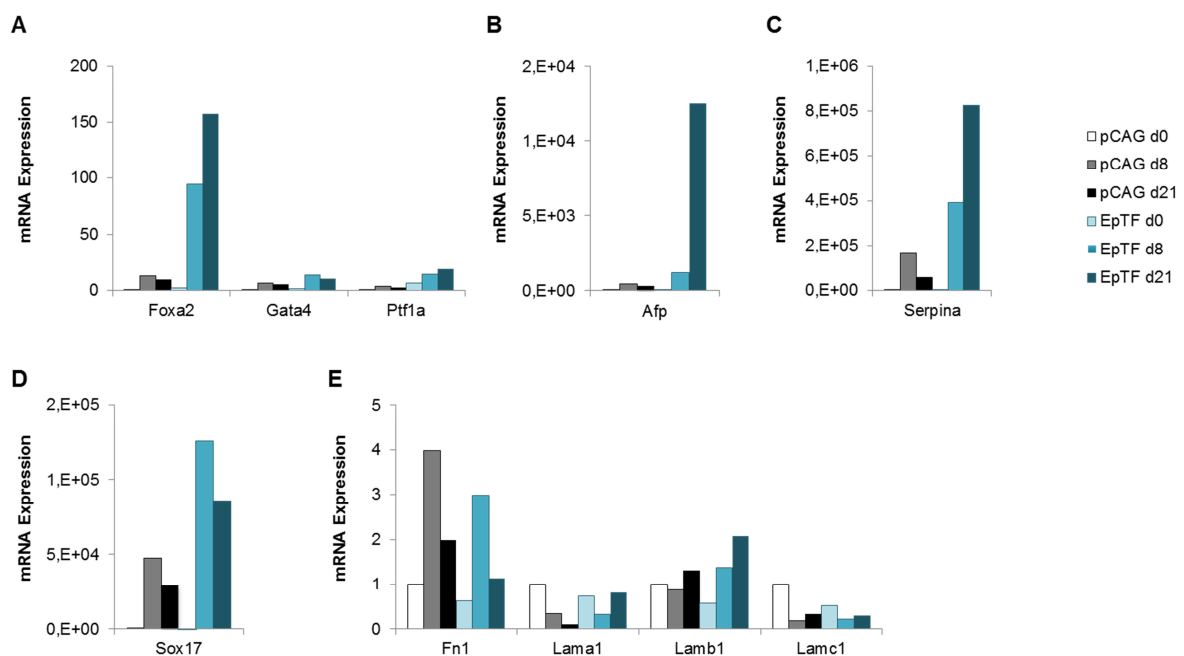
**Abbildung 4.37: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von endothelialen Markern.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese



der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) und (B) sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Die Regulation von Genen des extra-embryonalen (A), des viszeralen (B, C) und parietalen (D, E) Endoderms sind in Abbildung 4.38 visualisiert. Während die Marker des viszeralen Endoderms in Zellen mit exogenem EpCAM extrem erhöht vorlagen, war dies im Falle der Marker des extra-embryonalen Endoderms nur für Foxa2 gegeben. Obgleich Gata4 und Ptf1a nicht derart starken Veränderungen unterlagen, konnte auch für sie eine Erhöhung der Expression in Folgen von EpCAM in den Zellen gezeigt werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Gata4 nicht ausschließlich in der endodermalen Differenzierung, sondern auch in der Entwicklung des Herzens eine wichtige Rolle spielt. So verursachen Mutationen dieses Gens einen Atrium-Septumdefekt (Yang *et al.* 2013). Die Differenzierung zu parietalem Endoderm war diversen Expressionsschwankungen unterlegen. War die Expression von Sox17 im Überexpressionssystem noch stark angehoben, so war keine Veränderung in derjenigen aller anderen, dargestellten Gene vorhanden.

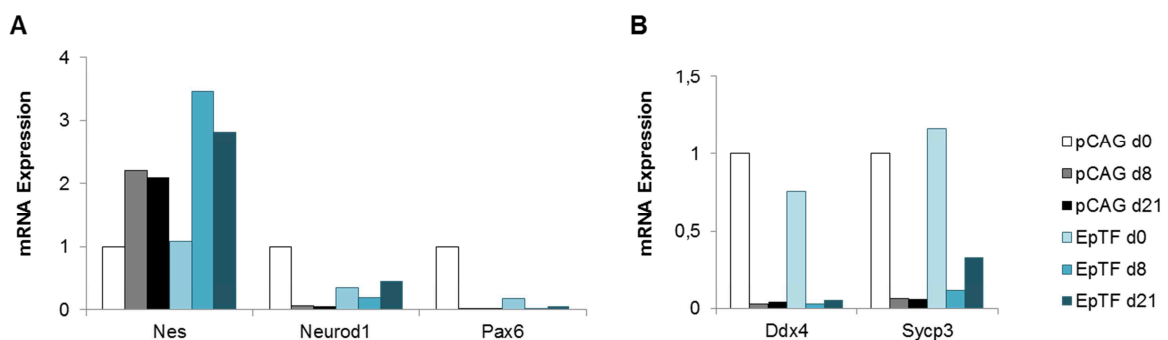


**Abbildung 4.38: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von endodermalen Genen.**

Die Zelllinien E14TG2α-EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2α-ΔpCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro*

Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. Das Diagramm zeigt Expressionsänderungen des extra-embryonalen (A), des viszeralen (B, C) und parietalen (D, E) Endoderms. Die Ergebnisse wurden aus einer Messung berechnet.

Abbildung 4.39, mit den letzten Ergebnissen des Arrays, stellt zum einen ektodermale, neuronale Marker (A), zum anderen Keimzellmarker (B) dar. Die Gene der Neuronalentwicklung, Nes, Neurod1 und Pax6, wiesen alle ein unterschiedliches Expressionsmuster und eine diverse Regulation auf. Nes ließ in den untersuchten Zelllinien beinahe denselben Verlauf der Expression erkennen, während Neurod1 an Tag null eine geringere, an den beiden anderen Tagen aber eine erhöhte Expression in den Überexpressionszellen zeigte. Obwohl Pax6 ein ähnliches Expressionsmuster präsentierte, war dies aber in den Zellen mit exogenem EpCAM sehr viel niedriger. Die Analyse der untersuchten Keimzellmarker wies im Vergleich zur Kontrolle zum einen eine identische Regulation von Ddx4, zum anderen eine gering erhöhte Expression von Sycp3 an Tag 21 auf.



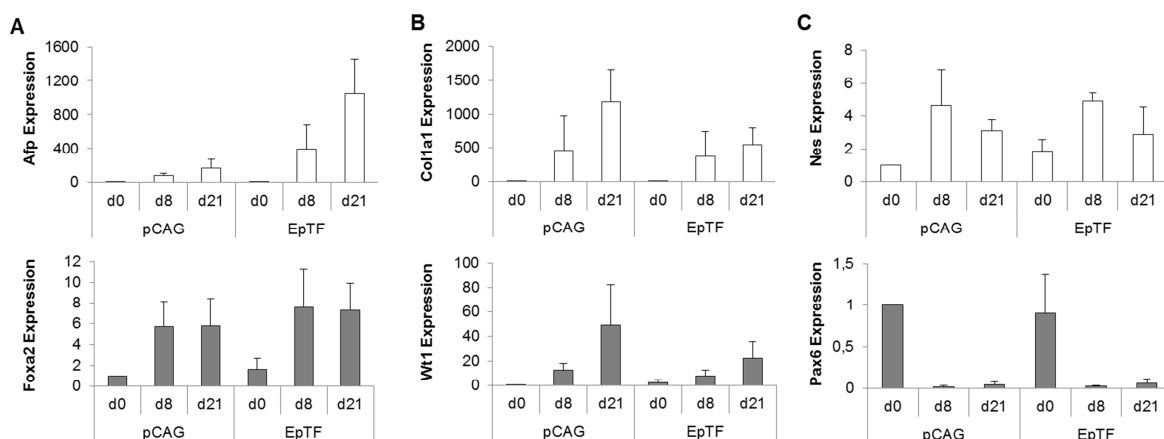
**Abbildung 4.39: Auswirkungen der Differenzierung und EpCAM Überexpression auf die Regulation von ektodermalen und Keimzell-Markern.**

Die Zelllinien E14TG2 $\alpha$ -EpCAM-TF (im Diagramm als EpTF bezeichnet) und E14TG2 $\alpha$ - $\Delta$ pCAG (im Diagramm mit pCAG benannt) wurden der in Abschnitt 3.1.5 erläuterten *in vitro* Differenzierung unterzogen. Die EBs wurden an den Tagen 0, 8 und 21 (d0, d8, d21) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA (siehe 3.2.2) wurde ein Differenzierungsarray der Firma Roche durchgeführt. In (A) ist die Expression verschiedener neuronaler und in (B) die Expression zweier Keimzellmarker zu erkennen. Es sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Da der Differenzierungsarray für jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt nur einmal durchgeführt wurde, mussten alle Marker unter Verwendung von SYBR Green und

quantitativer PCR validiert werden. Erste, dahingehende Versuche (Daten nicht gezeigt) führten eine Reihe von Genen auf, die aufgrund der niedrigen Expression in den Stammzellen nicht exakt vermessen werden konnten.

Wie eingangs erwähnt, stellte sich die Frage, ob die EpCAM Überexpression neben dem Einfluss auf die mesodermale Entwicklung auch Auswirkungen auf die Differenzierung der Zellen der anderen beiden Keimblätter hat. Deshalb wurden jeweils zwei bis drei verschiedene Keimblatt-spezifische Gene ausgewählt, mittels qPCR vermessen, auf Tag null der Kontrollzelllinie normiert und in Abbildung 4.40 dargestellt. Die cDNA, die in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde, wurde den Zeitreihe-Versuchen entnommen, die in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3 ausführlich beschrieben sind. Die Auswahl der Gene erfolgte in Kenntnis der vorangegangenen, bereits erwähnten Validierungsversuche. Es sind in (A) zwei endodermale, in (B) zwei mesodermale und in (C) zwei ektodermale Marker zu sehen. Die Analyse der Messergebnisse endodermaler Gene ließ eine sehr starke (Afp) beziehungsweise schwache, nicht-signifikante (Foxa2) Erhöhung der Werte in Verbindung der EpCAM Überexpression erkennen.



**Abbildung 4.40: Validierung einiger Expressionsmuster von endo-, meso- und ektodermalen Markern aus dem Differenzierungsarray.**

Die Zelllinie E14TG2α-EpCAM-TF (im Diagramm EpTF) und deren Kontrollzelllinie E14TG2α-ΔpCAG (im Diagramm pCAG) wurden in *hanging drops* ausplattiert. Die entstandenen EBs wurden in *ultra-low attachment*- und später in Gelatine-beschichtete Multiwellplatten transferiert und einen Tag bzw. 14 Tage darin inkubiert (siehe 3.1.5). Die EBs wurden nach 0, 8 und 21 Tagen geerntet. Nach Isolierung der RNA wurden die cDNA synthetisiert (siehe 3.2.2), welche für die Validierung mittels RealTime quantitativer PCR verwendet wurde (siehe 3.2.3). Es wurden Marker des endo- (A), meso- (B) und ektodermalen (C) Keimblatts

analysiert. Die gemittelten Ergebnisse dreier eigenständiger Versuche wurden mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen.

Entgegengesetzt verhielt es sich mit den Markern des mesodermalen Keimblatts. Hier war bei beiden Genen, Col1a1 und Wt1, ein Rückgang der Expression an Tag 21 der Differenzierung zu verzeichnen. Dagegen gab es in Zusammenhang mit EpCAM kaum Unterschiede in der Stärke und dem Verlauf der Expression der ausgewählten ektodermalen Marker Nes und Pax6.

Diese Ergebnisse und auch der bereits beschriebene Phänotyp ließen den Schluss zu, dass eine EpCAM Modulation in Form einer exogenen Expression des Proteins einen hemmenden Einfluss auf die mesodermale Entwicklung der Zellen hat. Eine verstärkte Entwicklung der Zellen in endodermale Richtung erschien plausibel, muss allerdings in nachfolgenden Arbeiten näher untersucht werden. Keine Auswirkungen aber schien die Überexpression des Proteins auf die Differenzierung in Zellen des ektodermalen Keimblatts zu haben.

## 5 DISKUSSION UND AUSBLICK

EpCAM wurde erstmals 1979 als Tumorantigen, das nach Immunisierung von Mäusen die Produktion spezifischer Antikörper induzierte (Herlyn *et al.* 1979), beschrieben. Mit Hilfe biochemischer Methoden konnte EpCAM Jahre später als glykosyliertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 37 bis 42 kDa identifiziert werden (Gottlinger *et al.* 1986a, Gottlinger *et al.* 1986b). Des Weiteren offenbarten Studien der Gruppe um Sergey Litvinov eine Funktion EpCAMs als homophiles  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiges Zelladhäsionsmolekül und eine Korrelation mit der Proliferation von Zellen (Litvinov *et al.* 1994b, Litvinov *et al.* 1996, Litvinov *et al.* 1997). Für transformierte epitheliale Zellen und Fibroblasten konnte 2004 ein Effekt bezüglich der EpCAM Expression auf die Proliferation bestätigt werden (Munz *et al.* 2004, Osta *et al.* 2004). Im Zuge dessen wurde dem Molekül von Münz *et al.* eine Rolle in der Regulation Zellzyklus-spezifischer Gene, wie *c-myc*, *cyclin A* und *cyclin E* zugeteilt (Munz *et al.* 2004). Außer diesen wurden noch andere Zielmoleküle hinsichtlich der Regulation von Proliferation (Munz *et al.* 2004, Maaser and Borlak 2008, Munz *et al.* 2009, van der Gun *et al.* 2010, Gostner *et al.* 2011), aber auch des Zellmetabolismus (Maaser and Borlak 2008) beschrieben. Darauf aufbauend wurde 2009 von unserer Gruppe die aktive Teilnahme von humanem EpCAM an der Signaltransduktion und dessen genauer Ablauf in HEK293 Karzinomzellen publiziert (Maetzel *et al.* 2009). Die Aktivierung von EpCAM als proliferationsförderndes Protein basiert auf einer regulierten Intramembranproteolyse (kurz RIP), durch die das Protein sequentiell gespalten wird. Dabei wird zum einen der extrazelluläre Teil, EpEX, zum anderen EplCD, der intrazelluläre Part, abgespalten. In einem Komplex mit  $\beta$ -Catenin und FHL2 transloziert EplCD in den Kern, um dort den Transkriptionsfaktor Lef-1 zu binden und auf diese Weise bestimmte Zielgene, wie *c-myc*, zu regulieren (Maetzel *et al.* 2009, Chaves-Perez *et al.* 2013, Schnell *et al.* 2013b). Wie in der Einleitung beschrieben, konnte parallel zu der vorliegenden Arbeit in unserer Gruppe eine RIP-induzierte Spaltung in murinen embryonalen

Stammzellen nachgewiesen werden (Hachmeister *et al.* 2013). Dabei wurde einerseits eine  $\beta$ -Sekretase, BACE-1 identifiziert, die abgesehen von Metalloproteasen das murine EpCAM proteolytisch in der extrazellulären Domäne spaltet, andererseits wurde ein Proteasom-abhängiger Abbau des intrazellulären Spaltprodukts EpICD bewiesen (Hachmeister *et al.* 2013).

Bereits wenige Jahre nach der Erstbeschreibung wurde klar, dass EpCAM in Karzinomen verschiedener Lokalisationen stark exprimiert wird (Moldenhauer *et al.* 1987, Momburg *et al.* 1987), wobei eine Überexpression mit einem verminderten Überleben und schlechter Prognose in Verbindung stand (Spizzo *et al.* 2004, Varga *et al.* 2004, Spizzo *et al.* 2006). Heute wird EpCAM als pan-Karzinom Marker bezeichnet (Chaubal *et al.* 1999, Winter *et al.* 2003b). Obgleich in unterschiedlicher Stärke, wird das Protein aber auch in vielen adulten und gesunden unstratifizierten Epithelien exprimiert (Cirulli *et al.* 1995, Balzar *et al.* 1999b, Trzpis *et al.* 2007a). Allerdings wurden auch gesunde Gewebe beschrieben, in welchen der Grad der Differenzierung mit der EpCAM Expression korrelierte. Bestes Beispiel für die variable Expression des Moleküls in der Plastizität von Geweben ist die Leber. EpCAM konnte in der Leber nur in regenerativen Zellen, wie Leberstammzellen oder Hepatoblasten, nicht aber muren Hepatozyten nachgewiesen werden (Momburg *et al.* 1987, de Boer *et al.* 1999, Okabe *et al.* 2009, Yoon *et al.* 2011, Gires 2012). Und obwohl in hepatozellulären Karzinomen eine intermediäre Expression des Proteins gezeigt wurde (Yamashita *et al.* 2009), so konnten wenige Zellen in diesen maligne transformierten Geweben als stark EpCAM exprimierend identifiziert werden (Yamashita *et al.* 2009, Sun *et al.* 2013, Yamashita *et al.* 2013). Diese in vielen Tumorentitäten vorkommende Subpopulation, bekannt als Tumor-initiierende (TICs), Krebsstamm- (CSCs) oder Zirkulierende Tumorzellen (CTCs), zeigt Stammzell-ähnliche Charakteristika, wie Selbsterneuerung. Auch weisen diese Zellen die Fähigkeit auf, in viele, phänotypisch unterschiedliche Tumorzellen zu differenzieren (Al-Hajj *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Clevers 2011). Neben EpCAM sind in TICs unter anderem die Proteine CD 44, CD133, ALDH und Nestin exprimiert. Stellen sie auch keine Universalmarker dar, so sind sie doch in den meisten Entitäten zu finden (Gires 2011). Zur Erhaltung ihres charakteristischen Phänotyps sind TICs auf eine Reihe von Signalwegen, wie den Wnt-, Sonic Hedgehog- und Notch-Signalweg

angewiesen (Taipale and Beachy 2001, Takebe *et al.* 2011a, Takebe *et al.* 2011b), die auch in embryonalen Stammzellen eine große Rolle in der Erhaltung der Pluripotenz und der Differenzierung spielen (Boiani and Scholer 2005, Liu *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Vor wenigen Jahren gelang es Wissenschaftlern somatische Zellen in Stammzell-ähnliche Zellen mit pluripotentem Phänotyp, sogenannte iPS (*induced pluripotent stem cells*) Zellen, zu generieren (Hanna *et al.* 2009, Lyssiotis *et al.* 2009, Hanna *et al.* 2010). Im Zuge dessen wurden die Faktoren c-Myc, Klf4, Oct4 und Sox2 identifiziert, die als essentiell für die Reprogrammierung der Zellen gezeigt wurden (Lu *et al.* 2010). Die Expression von EpCAM und von EplCD erhöhte die Effizienz und damit die Frequenz der Reprogrammierung adulter Zellen zu iPS (Lu *et al.* 2010, Huang *et al.* 2011). War die Reprogrammierung nicht nur von einer steigenden Expression des Markers gekennzeichnet, so steigerte dessen Überexpression sogar die Effizienz des Prozesses, während dessen Inhibition das Gegenteil bewirkte (Huang *et al.* 2011).

All diese Erkenntnisse über das Potenzial von EpCAM Zielgene zu regulieren, Pluripotenz aufrecht zu erhalten und die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu beeinflussen, ließen die Hypothese zu, dass das Protein sowohl das Herbeiführen, als auch das Erhalten des Phänotyps von embryonalen Stammzellen, Gewebsvorläuferzellen, TICs, iPS Zellen und Krebszellen beeinflussen kann (Imrich *et al.* 2012).

Die phänotypische Ähnlichkeit embryonaler Stammzellen mit iPS Zellen und TICs und die klinische Relevanz letzterer, veranlassten unsere Arbeitsgruppe die Expression von EpCAM bei der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorangegangenen Studien und die Resultate dieser Arbeit diskutiert.

## **5.1 Auswirkungen der 3D-Differenzierung auf die EpCAM Expression in murinen embryonalen Stammzellen**

Zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Phänotyps embryonaler Stammzellen gehört außer dem Wnt- und BMP- (*Bone Morphogenic Proteins*) Signalweg, die Bindung von LIF (*leukemia inhibitory factor*) an den LIF Rezeptor zu den zentralen Mechanismen

(Matsuda *et al.* 1999, Ying *et al.* 2003, Sato *et al.* 2004). Dieses Mitglied der Interleukin-6 Familie (Okita and Yamanaka 2006) steuert über die Kerntranslokation von Stat3 die Regulation von Zielgenen von LIF und somit die Selbsterneuerung der murinen Zellen (Varga and Wrana 2005). Durch das Entziehen des Faktors aus dem Kulturmedium von E14TG2 $\alpha$  Zellen wird die künstliche Aufrechterhaltung des pluripotenten Phänotyps gestoppt, die Differenzierung der Zellen wird eingeleitet. Diesen Prozess konnten González *et al.* in ihrer Arbeit 2009 mit der Reduktion verschiedener Stammzellmarker wie c-Myc, Oct3/4, Stat3 und SSEA-1 bestätigen. Damit einhergehend konnte auch ein Rückgang der Expression von EpCAM in den Zellen beobachtet und somit EpCAM erstmals als Marker des Differenzierungsgrades von ES Zellen beschrieben werden. Weiterhin wurde eine verminderte Proliferation vermerkt. Die erneute Zugabe des Faktors LIF zu den Zellen ließ die Differenzierung reversibel erscheinen, obgleich nicht unumstritten, dass es, statt einer direkten Reaktion auf das Zytokin, eine Folge der Proliferation und Akkumulation noch nicht differenzierter, pluripotenter Zellen war (Gonzalez *et al.* 2009). Wie auch die eben zusammengefassten Resultate stammen die meisten publizierten Ergebnisse aus zweidimensionalen Untersuchungen pluripotenter embryonaler Stammzellen. Vor einiger Zeit aber wurden die Vorteile von Analysen an dreidimensionalen Organisationen in ihrer Analogie zur embryonalen Entwicklung erkannt. Die Zellen beider Strukturen unterliegen dynamischen Prozessen, die ihr Überleben, ihre Selbsterneuerung und die Differenzierung regulieren. Dabei ist die räumliche und auch zeitliche Regulation molekularer, struktureller, mechanischer, hydrodynamischer und elektrischer Signale von herausragender Bedeutung (Hsiao and Palecek 2012). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die dreidimensionale Differenzierung mit Hilfe der *hanging drop*-Methode verwendet. Im Gegensatz zur Differenzierung pluripotenter Zellen in Suspensionskultur, bei der die Zellen in homogener Lösung bis zur Akkumulation geschüttelt werden, konnte damit sowohl die Größe der EBs, wie auch die Entwicklung in Zellen aller drei Keimblätter reproduzierbar sichergestellt werden (Kurosawa 2007, Mogi *et al.* 2009). Der genaue Ablauf ist in Abbildung 4.1 (**A**) skizziert. Wie bereits für andere murine embryonale Stammzelllinien gefunden, waren die frisch generierten EBs an Tag 3 in (**B**) kugelförmig und dicht gepackt (Koike *et al.* 2007, Rungarunlert *et al.* 2009),



veränderten sich aber im Laufe der Zeit und der einhergehenden Differenzierung der Zellen. Diese konnte, wie schon im zweidimensionalen System, anhand der abnehmenden Expression der Pluripotenzmarker SSEA-1 und Oct3/4 belegt werden (siehe Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3). Obwohl die Differenzierung mit Hilfe dieser Methode auch mit einer negativen Regulation von EpCAM auf den eben genannten Ebenen einherging (siehe Abbildung 4.2 und Abbildung 4.4), so konnte kein sofortiger Proliferationsrückgang verzeichnet werden (siehe Abbildung 4.5 (**B**)). Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p53 untersucht, deren mRNA im Laufe des Differenzierungsprozesses reduziert wurde (siehe Abbildung 4.5 (**A**) und (**C**)). Dies war zu erwarten, da neben der Seneszenz, dem Altern der Zelle, die Differenzierung der einzige Prozess in Säugerzellen ist, der mit einem Zellzyklusarrest einhergeht (Myster and Duronio 2000, Wainwright *et al.* 2001, Miller *et al.* 2007). Interessanterweise konnten Tang *et al.* durch die Hemmung der Proliferation bei Oligodendrozytenvorläufern und des Fehlens an regulierten Differenzierungsmarkern zeigen, dass der Arrest des Zellzyklus allein nicht ausreicht, sondern eine Modulation von Signalwegen nötig ist, um eine Differenzierung der Zellen zu induzieren (Tang *et al.* 1999). Somit ist der Rückgang der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und p53 vermutlich ein additiver oder sekundärer Effekt der Differenzierung und kein auslösendes Ereignis hierfür.

In humanen embryonalen Stammzellen wurden mit Hilfe von Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) epigenetische Modifikationen des *Epcam* Promotors in Form von Histon Methylierungen als Ursache für dessen Differenzierungs-abhängige Repression erkannt (Lu *et al.* 2010). Unter anderem wurden Trimethylierungen des Histon 3 an Lysinen in Position 4 und 27 (H3K4me3, H3K27me3) analysiert, die positiv (H3K4me3) beziehungsweise negativ (H3K27me3) mit der Genregulation korrelieren (Sims *et al.* 2003, Gu and Lee 2013). Die Gruppe um T.Y. Lu verglich in ihren Experimenten pluripotente mit differenzierten Zellen, konnte aber für H3K4me3 kein einheitliches Bindungsverhalten an den unterschiedlichen, getesteten Promotor-Positionen feststellen. Die reprimierende Methylierung an Lysin 27 dagegen war in den differenzierten Zellen durchweg deutlich erhöht. Aufgrund des Rückgangs des Pluripotenzmarkers Oct3/4 wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung sowohl der aktivierenden, wie auch der reprimierenden Methylierung untersucht. Es konnte

gezeigt werden, dass die Trimethylierung von H3K4 in Folge der Differenzierung der Zellen verringert wurde, während die Trimethylierung von H3K27 am humanen *EPCAM* Promotor, je nach Promotorbereich, um das 3- bis 10-fache stieg (Lu *et al.* 2010). Um zu testen, ob die in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.5 beschriebene EpCAM Regulation in murinen embryonalen Stammzellen ebenfalls epigenetische Komponente besitzt, wurden mittels Chromatin Immunopräzipitation (siehe 2.7.3) die Bindung der Polymerase II und die Trimethylierung von Histon 3 (H3K4me3, H3K27me3) an den *Epcam* und *Oct3/4* Promotoren untersucht. Dafür wurden pluripotente E14TG2 $\alpha$  Zellen differenziert und, wie in Abschnitt 2.7.3 detailliert erläutert, behandelt.

Ähnlich wie im Rahmen der Differenzierung humaner Stammzellen war die verminderte Expression von EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen mit einer Zunahme der reprimierenden Histon-Methylierung am Promotor von *Epcam* verbunden (siehe Abbildung 4.8 (C)). Dazu passend ist in derselben Abbildung, Teil (D), eine aktivierende Trimethylierung von Lysin in Position 4 zu sehen. Regionen, die diese beiden Histonmethylierungen aufweisen, werden bivalent genannt und sind in an den Promotoren der meisten Stammzellgene zu finden, um vermutlich von einem repressiven Status der Genexpression ausgehend, ein schnelles Anschalten von Differenzierungsgenen zu ermöglichen (Bernstein *et al.* 2006). Abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen und den aktivierenden (H3K4me3) oder reprimierenden (H3K27me3) Methylierungen weisen diese Regionen unterschiedliche Chromatin-Eigenschaften auf (Serrano *et al.* 2013). Zeichnen sich pluripotente Stammzellen durch offenes Chromatin und eine globale, sehr hohe Transkriptionseffizienz aus (Min *et al.* 2011), so postulierten Serrano *et al.* (2013), dass eine Differenzierung der Zellen mit einer Kondensation des Chromatins und einer globalen Heterochromatinisierung assoziiert ist. Das offene, Nuklease-sensitive Chromatin an aktiven Promotoren ist dabei an die aktivierende Trimethylierung des Lysin in Position 4 der Nukleosomstabilität gekoppelt (Guenther *et al.* 2007, Mikkelsen *et al.* 2007, Barrera *et al.* 2008). Die Nukleosomstabilität per se spielt keine Rolle in der Regulation, da die Methylierung eines Lysinrests dessen positive Ladung nicht beeinflusst und diese Modifikation somit wenig an der Transkription eines Gens verändert (Zentner and Henikoff 2013). Darüber hinaus führte eine künstliche

Inhibierung eines der Methylierungskomplexe, bestehend unter anderem aus der Methyltransferase H3K4, zwar zu einer drastisch reduzierten Trimethylierung von Lysin 4 in Histon 3, hatte aber nur einen sehr geringen transkriptionellen Effekt (Jiang *et al.* 2011, Lenstra *et al.* 2011). Dies warf den Gedanken auf, dass die hauptsächliche Funktion dieser Trimethylierung möglicherweise nicht die direkte transkriptionelle Regulation ist (Zentner and Henikoff 2013). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung der Polymerase II an den *Epcam* Promotor als direkte Regulationsmöglichkeit untersucht. Mit zunehmendem Grad der Differenzierung wurde eine rasch verminderte Bindung der Polymerase II an den *Epcam* Promotor gemessen. Schon am siebten Tag (d7) des Versuchs war die Bindung um mehr als 80 Prozent verringert. Die Abnahme der Bindung der Polymerase II an den *Epcam* Promotor, die damit einhergehende Reduktion des Transkripts und damit auch des Proteins erlaubte so eine schnelle und direkte Regulation. Die in Abbildung 4.8 präsentierten Ergebnisse fassen drei Messungen mit nur einem Primerpaar EpCAM 1 (siehe 2.3.1) zusammen, konnten aber unter Verwendung eines weiteren Primerpaares bestätigt werden (siehe 2.3.1 EpCAM 2; Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Chromatin Immunopräzipitation am *Oct3/4* Promotor dagegen entstammten Messungen mit nur einem Primerpaar (siehe 2.3.1). Sie spiegelten nahezu identisch das Bindungsverhalten an den *Epcam* Promotor wider und erklärten den Abfall des *Oct3/4* Transkripts in Abbildung 4.3. Dies bedeutete eine Abnahme der Bindung von Pol II und H3K4me3, und eine verstärkte Akkumulation von H3K27me3 im Laufe des Differenzierungsprozesses (siehe Abbildung 4.9).

Bereits 2007 wurden EBs muriner embryonaler Stammzellen auf die EpCAM Expression der einzelnen Zellen dieses dreidimensionalen Verbunds untersucht (Trzpis *et al.* 2007a). Die Auswertung der angefärbten EBs ließ hinsichtlich der Expression des Proteins drei verschiedene Zellpopulationen erkennen. Die erste der drei Populationen war anhand der starken intrazellulären Färbung von der zweiten mit einer ausschließlich membranständigen EpCAM Expression zu unterscheiden. In der dritten Population jedoch war EpCAM lediglich an den Zell-Zell-Kontakten, nicht innerhalb der Zelle wahrzunehmen. M. Trzpis und Kollegen folgerten daher eine Assoziation der Expression mit der Differenzierung der Zellen. Eine Unterteilung der

angefärbten EBs in drei verschiedene Populationen war auch in dieser Arbeit möglich, allerdings erfolgte diese unabhängig vom EpCAM Expressionsmuster der einzelnen Zellen und vielmehr aufgrund der Zellmorphologien (siehe Abbildung 4.10). Die Expression von EpCAM in den Einzelzellen der verschiedenen Differenzierungsstadien war hauptsächlich an der Membran und sehr selten intrazellulär zu erkennen. Jedoch bildeten sich im Laufe des Experiments, sichtbar bereits ab Tag vier (d4), drei morphologisch divergente Zellpopulationen aus. Zum einen bildeten die Zellen des äußeren Randes, die auch nach 21-tägiger Differenzierung nichts von ihrer EpCAM Expression eingebüßt hatten, dicht gepackt eine epitheliale Umrandung der gesamten Struktur. Diese basolaterale EpCAM Expression ist detailliert auch in Abbildung 4.11 zu erkennen und wurde bereits für humanes EpCAM *in vivo* in normalen Epithelien beschrieben (Litvinov *et al.* 1994a). Gesundes Brustdrüsengewebe zeigte *in vivo* eine basolaterale Expression von EpCAM, während Zellen des Primärkarzinoms derselben Entität und Metastasen einen Verlust der basolateralen Expression von EpCAM und eine Verteilung des Proteins über die gesamte Zelloberfläche aufwiesen. *In vitro* konnte in Folge eines EpCAM Rückgangs in Tumorzellen weiterhin ein Verlust der Zellpolarität beobachtet werden (Martowicz *et al.* 2013). Zum anderen befanden sich im Inneren des dreidimensionalen EBs zwei weitere Zelltypen, die sich bezüglich der Größe des Kerns und des Zytoplasmas stark unterschieden. Experimente verschiedener Arbeitsgruppen bewiesen, dass die *in vitro* Differenzierung mit Hilfe der Generierung von EBs alle drei Keimblätter, Endo-, Meso- und Ektoderm, und deren Derivate hervorbringt und damit die frühe Entwicklung von Säugerzellen *in vivo* rekapituliert werden kann (Desbaillets *et al.* 2000, Itskovitz-Eldor *et al.* 2000). Daher ist ein künftiges Ziel unserer Arbeiten die detaillierte Charakterisierung der drei Zelltypen in EBs und die Definition EpCAM-positiver Zellen. Begonnen wurde mit dem mesodermalen Marker Vimentin (Weinhold *et al.* 2000), dessen Färbungsmuster an zwei verschiedenen EBs nach viertägiger Differenzierung in Abbildung 4.12 veranschaulicht wird. Der Vergleich konsekutiver Schnitte zeigten eine inverse Expression von EpCAM und Vimentin. Davon ausgehend kann bestätigt werden, dass EpCAM in mesodermalen Derivaten nicht exprimiert wird, ein Befund, der kongruent mit der fehlenden Expression EpCAMs in Tumoren meso- oder

ektodermalen Ursprungs (Momburg *et al.* 1987) und mit dem Vorhandensein in epithelialen Tumorentitäten, *i.e.* Karzinomen, ist (Momburg *et al.* 1987). Um Zellen der anderen beiden Keimblätter nachweisen und bestimmen zu können, sollen in nachfolgenden Versuchen weitere Schnitte mit Antikörper gegen Marker des Ekto- und Endoderms, wie Nestin und Afp (Roche *et al.* 2005, Qu *et al.* 2012), angefärbt werden.

## **5.2 EpCAM hat einen Einfluss auf die *in vitro* Differenzierung**

Die Expression von EpCAM *in vivo* ist invers mit Differenzierungsprozessen korreliert. Wie in ES Zellen ist EpCAM in adulten Organismen nicht nur ein Marker für Epithel und hämatopoetische Vorläuferzellen, sondern auch mit einem Anstieg der epithelialen Proliferation verbunden (Balzar *et al.* 1999b, Went *et al.* 2004, Zanna *et al.* 2007, Trzpis *et al.* 2008a). Kürzlich konnte dem murinen Protein durch Untersuchung eines konditionalen EpCAM Knock-out Modells zur Inaktivierung der Expression in Langerhans Zellen eine Funktion in der intrazellulären Adhäsion, Migration und Zellmotilität nachgewiesen werden (Gaiser *et al.* 2012). Weiterhin beschrieben Nagao *et al.*, dass alle homozygot EpCAM-defiziente Mäuse im Entwicklungsstadium E12.5 aufgrund eines Plazentadefekts verstarben (Nagao *et al.* 2009). Obwohl eine weitere Arbeitsgruppe dieselbe Methode verwendete, um homozygot defiziente Mäuse zu generieren, war das Ergebnis ihrer Analysen divergent (Guerra *et al.* 2012). EpCAM Knock-out Tiere starben nicht an Defekten der Plazenta und wurden lebend geboren, zeigten aber früh intestinale, epitheliale Dysplasien, deren Charakteristika Eigenschaften einer humanen CTE (congenital tufting enteropathy) Erkrankung entsprachen. Diese lebensbedrohliche Fehlentwicklung des humanen Darms, die Folge einer inaktivierenden Keimbahnmutation des *Epcam* Gens, manifestiert sich mit Beginn der Geburt und führt zu großen Läsionen im intestinalen Epithel mit Zottenatrophie, einer Hyperplasie der Krypten und einer fokalen Verdrängung von Enterozyten (Calabrese *et al.* 2001, Goulet *et al.* 2007, Sivagnanam *et al.* 2008, Guerra *et al.* 2012). *In vitro* konnten in murinen embryonalen Stammzellen Effekte einer EpCAM Deletion auf die Proliferation und die Regulation von Zielgenen wie c-Myc, Oct3/4, Stat3 und SSEA-1

verzeichnet werden (Gonzalez *et al.* 2009). Auch in humanen pluripotenten Stammzellen wurde eine Deletion des Proteins auf etwaige Auswirkungen hin untersucht (Ng *et al.* 2010). Die Herunterregulierung des Gens führte zu einer marginal verminderten Expression Stammzell-spezifischer Gene, einer stark gesenkten Proliferation und einer deutlich angehobenen Expression endo- und mesodermaler Gene.

Während also die Deletion von EpCAM sowohl *in vivo*, wie auch *in vitro* bereits analysiert wurde, wurde die exogene Überexpression von EpCAM und deren Einfluss auf die Differenzierung und Entwicklung muriner embryonaler Stammzellen erst in dieser Arbeit näher betrachtet. Dazu wurden neben der Morphologie der generierten EBs auch die transkriptionellen Veränderungen verschiedener Zellzyklus- und Proliferationsmarker untersucht. Weder der morphologische (siehe Abbildung 4.14), noch der Vergleich der Expressionsmuster von p53, Cyclin D1 und Ki67 (siehe Abbildung 4.18) ergaben Unterschiede zwischen der Überexpressions- und der Kontrollzelllinie. Deshalb war anzunehmen, dass EpCAM in 3D-differenzierenden murinen Stammzellen keinen bedeutsamen Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation. Aus den Bildern der Abbildung 4.14 kann außerdem eine EpCAM-unabhängige Generierung von morphologisch ähnlichen dreidimensionalen Strukturen geschlossen werden. Des Weiteren konnte durch quantitative Analysen (siehe Abbildung 4.19) bewiesen werden, dass die exogene Expression von EpCAM keine Auswirkungen auf die Anzahl der generierten EBs hatte. Durch Vorversuche konnte außerdem bekräftigt werden, dass die Zahl der gebildeten EBs trotz eines Knock-outs des Proteins gleichblieb (Daten nicht gezeigt). Ungeachtet der starken Überexpression von EpCAM in pluripotenten Zellen (siehe Abbildung 4.13) konnte eine Abnahme des Pluripotenzmarkers SSEA-1 auf der Oberfläche und die damit einhergehende Differenzierung der Zellen nicht verhindert werden. Auffällig war, dass die Gesamtmenge an EpCAM an der Membran der Zellen im Laufe der Differenzierung abnahm, auch wenn dessen Expression exogen durch den sehr starken CAG (CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin)-Promotor, der eine stabile Expression des Transgens während Differenzierungsprozessen von Stammzellen verspricht (Alexopoulou *et al.* 2008), übernommen wurde. Die Regulation des ektopisch exprimierten Gens weist auf den enorm hohen Druck des

Differenzierungsprozesses auf die Zelle, deren Metabolismus und die Expressionsmuster verschiedener Gene hin. Trotzdem war die absolute Expression von EpCAM in den überexprimierenden Zellen weiterhin deutlich höher als in den Zellen mit Kontrollplasmid, was auch auf transkriptioneller Ebene erkennbar war (siehe Abbildung 4.16). Warum es den Zellen trotz des starken Promotors möglich war auch exogenes Protein oder Transkript zu regulieren, wirft Fragen auf. Charakterisierende Untersuchungen der Gruppe um A. Alexopoulou stellten eine Eignung des Promotors in undifferenzierten und mesodermal differenzierenden Zellen fest, trafen aber keinerlei Aussage über die Möglichkeit der Nutzung in endo- oder ektodermalen Entwicklungsprozessen (Alexopoulou *et al.* 2008). Des Weiteren scheint nicht ausschließlich die Stärke der transkriptionellen Aktivität zu den wesentlichen Merkmalen eines Promotors zu gehören. Vielmehr ist die Phasen- oder Zeit-spezifische Aktivität des Promotors eine wichtige Eigenschaft, wenn die Differenzierung von Zellen untersucht werden soll. So konnte der CAG-Promotor in EBs nach dem EF1 $\alpha$  Promotor die höchste exogene Transkription herbeiführen (Hong *et al.* 2007). Die Ursache der Regulation des Transgens bleibt daher weiter offen und muss in kommenden Versuchen unter Verwendung anderer Promotoren näher untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte morphologische und mikroskopische Analysen führten zur Beobachtung von Kontraktionen im dreidimensionalen Zellverbund von Wildtyp-Zellen. Diese Kontraktionen beschränkten sich ausschließlich auf Teilbereiche der EBs. Um dies visuell zu unterlegen, ist dieser Arbeit eine CD beigelegt, die Videos mit kontraktile EBs beinhaltet. Früh schon wurde deutlich, dass die Differenzierung der pluripotenten embryonalen Stammzellen zu sogenannten Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) führt, die sowohl eine Erregbarkeit, wie auch spontane Kontraktion aufweisen (Wobus *et al.* 1991, Maltsev *et al.* 1994). Die *in vitro* Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zur Generierung von Herzmuskelzellen ist, durch die Involvierung einer initialen EMT (Epithelial-Mesenchymale-Transition), der mesodermalen und kardialen Spezifikation und Entwicklung und der elektrochemischen Reifung, ein mehrstufiger Prozess, den die Zellen durchlaufen müssen. Durch entscheidende Wachstumssignale, epigenetische Kontrollen und eine extrazelluläre Mikroumgebung wird dieser Prozess

straff organisiert (Burridge *et al.* 2012). Die Entwicklung zu muren Herzmuskelzellen zum einen und die Verfügbarkeit der Stammzellen zum anderen, schafften die Möglichkeit neue Erkenntnisse in der frühen Entwicklung des Herzens zu erlangen, die nicht nur in Hinsicht auf die Herzregeneration, sondern auch für die *in vitro* Erforschung neuer Medikamente von Bedeutung war (Hazeltine *et al.* 2013, Ou *et al.* 2013). Neben vielen pluripotenten murinen und humanen embryonalen Stammzelllinien (Boheler *et al.* 2002, Xu *et al.* 2002, He *et al.* 2003, Ou *et al.* 2013) wurden kürzlich auch humane iPS Zellen zur Generierung von Kardiomyozyten verwendet (Gai *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009).

Die bereits erwähnte Bedeutung von EpCAM in der embryonalen Entwicklung *in vivo* ließ auf eine eventuelle Relevanz des Proteins bei der Differenzierung *in vitro* schließen. Aus diesem Grund wurden aus verschiedenen EpCAM oder EpICD Überexpressionszelllinien, den entsprechenden Kontrollen und der Wildtyp-Zelllinie EBs generiert und mikroskopisch auf die Entwicklung zu Kardiomyozyten hin untersucht (siehe Abbildung 4.20). Während die Mutante mit der verkürzten EpCAM Variante (EpICD), wie auch die Kontrollen, keinen erheblichen Unterschied in der Frequenz der Ausbildung kontraktile Zellen zeigten, so hemmte EpCAM die Differenzierung zu Kardiomyozyten zum analysierten Zeitpunkt drastisch. Längerfristige Versuche zeigten, dass es in zwei von 12 Experimenten nach Tag zehn zu einer Bildung von Kardiomyozyten kam und dieser Block somit nicht vollständig, sondern zeitlich begrenzt erfolgte (Daten nicht gezeigt). Diesen Unterschied im Grad der Differenzierung zwischen bereits und (noch) nicht kontrahierenden Zellen untermauerte die beinahe zehnfach geringere Expression des Pluripotenzmarkers Oct3/4 in kontraktile EBs der Kontrollzelllinien (siehe Abbildung 4.21). EpCAM überexprimierende Zellen dagegen zeigten eine nahezu identische Expression in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs. Ein Blick auf die Menge an EpCAM Transkript in Abbildung 4.22 zeigte die mögliche Ursache dieses Phänomens auf. Hier nämlich erwies sich die starke Überexpression als sehr stabil, wodurch die Zellen zum analysierten Zeitpunkt gleichmäßig hohe EpCAM Mengen beinhalteten. Mit einem weiteren Marker,  $\alpha$ -CAA (*alpha cardiac actin*), konnte überdies geklärt werden, dass die identische Expression von EpCAM in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden EBs nicht auf den gleichen



Differenzierungsgrad hinwies. Dieser Marker, der nach  $\alpha$ -SMA (*alpha smooth muscle actin*), am Anfang der embryonalen Kardiomyozytenentwicklung, und parallel mit  $\alpha$ -SKA (*alpha skeletal actin*) im Myokard exprimiert wird, ist vorherrschend im adulten Herz zu finden (Ruzicka and Schwartz 1988). Die Expressionsveränderungen der Actin-Isoformen, die sich während der embryonalen Entwicklung zum adulten Organ abspielt, wurde auch *in vitro* in EBs bestätigt (Driesen *et al.* 2009). Die Expression des Marker also konnte die Erkenntnisse über den mit Oct3/4 bewiesenen, unterschiedlichen Differenzierungsgrad der beiden Untergruppen bestätigen.  $\alpha$ -CAA wurde, auch in der Überexpressionszelllinie, sehr viel stärker in den kontrahierenden EBs aller Zelllinien nachgewiesen (siehe Abbildung 4.23). Dies war erstaunlich, da es trotz gleicher Mengen an Oct3/4 und EpCAM auf unterschiedliche Phasen der Differenzierung in den kontrahierenden EBs hinwies. Auch in immunhistochemischen Färbungen konnten, im Gegensatz zu nicht-kontrahierenden EBs der EpCAM Expressionszelllinie, in kontrahierenden Kontrollzell-EBs kontraktile Kardiomyozyten in Form einer  $\alpha$ -CAA-Färbung veranschaulicht werden (siehe Abbildung 4.24). Die Kardiomyozyten akkumulierten ausschließlich in einem EpCAM negativen Bereich im Inneren der dreidimensionalen Struktur. Deshalb zeigen die Daten einen hemmenden Einfluss von EpCAM auf die mesodermale Differenzierung und die Generierung von Kardiomyozyten auf. Die molekularen Grundlagen für diese Hemmung sind Gegenstand derzeitiger, weiterführender Arbeiten unserer Gruppe. Weiterhin konnte der bereits erwähnte epitheliale Charakter der äußeren Zellen der Struktur mit der Überlagerung der EpCAM und CK8/18 Färbung des EBs der Kontrollzellen untermauert werden. CK8 und CK18 sind beide Marker für einfaches Epithel (Moll *et al.* 1982, Diaz-Guerra *et al.* 1992, Cimpean *et al.* 2008). Ein derartiges Übereinanderlegen der Färbungen war für die EBs der EpCAM Überexpressionszelllinie nur sehr bedingt möglich. Hier war nur in sehr stark EpCAM positiven Zellen CK8/18 exprimiert, was darauf schließen ließ, dass EpCAM allein eine epitheliale Differenzierung nicht induzieren kann.

### 5.3 Embryonale Entwicklung mit variierender EpCAM Expression

Die embryonale Entwicklung einer Maus beginnt mit der mehrfachen Teilung der befruchteten Eizelle und dem daraus entstehenden Blastomer. Anschließend wird aus diesem 8-Zellstadium durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellverdichtungen die Morula (Ziomek and Johnson 1980). Die darauffolgende asymmetrische Zellteilung bringt zwei verschiedene Zellpopulationen, innere und äußere Zellen hervor. Aus den pluripotenten inneren Zellen wird im weiteren Verlauf der Entwicklung erst die embryonale, ektodermale/ endodermale Innere Zellmasse (*inner cell mass*), die sich final zum eigentlichen Embryo entwickelt, während die äußeren Zellen das Trophoektoderm oder den Trophoblast, den Vorläufer der späteren Plazenta, ausbilden (Tarkowski and Wróblewska 1967, Johnson and Ziomek 1981, Shyh-Chang *et al.* 2013). Die Innere Zellmasse ist der Teil des frühen Embryos, aus dem pluripotente embryonale Stammzellen, wie die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie E14TG2 $\alpha$ , für die *in vitro* Kultur isoliert werden (Ding *et al.* 0000, Thomson *et al.* 1998, Li *et al.* 2003). Die Ausbildung der Blastozyste ist das erste offenkundige Zeichen einer Differenzierung zu Zellen verschiedener Funktion und dadurch von großem Interesse und Gegenstand vieler Studien (Brinster 1974, Motosugi *et al.* 2005, Yamanaka *et al.* 2006, Rossant and Tam 2009, Gasperowicz and Natale 2011). Mit der Bildung von Kanälen wird ein gleichzeitiger Einstrom von Ionen und Wasser in das Innere der Struktur erlaubt, was einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, das Blastozöl, erschafft. Die Entstehung dieses Blastozöls ist charakteristisch für die frühe Blastozyste, die sich an Tag vier *post coitum* (Embryonalstadium E4.5) in die Uteruswand des Muttertiers einbettet (Madan *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008). Dem Einpflanzen der Blastozyste folgen zwei Zwischenstufen, bevor die Gastrulation beginnt (Tam and Behringer 1997). Diesem Prozess sind die Bildung aller drei Keimblätter und die Anlagen des späteren Körpers zu verdanken (Tam and Loebel 2007). Eine schnelle Veränderung von Genexpression und –Funktion ist Grundvoraussetzung für den raschen Ablauf der Gastrulation in der Maus (Lim and Thiery 2012). Um dies zu bewerkstelligen, wird beispielsweise E-Cadherin sowohl transkriptionell, als auch posttranslational herunterreguliert (Zohn *et al.* 2006, Lee *et*

*al.* 2007, Hirano *et al.* 2008). Obwohl die Gastrulation in Mäusen aber bei weitem nicht so stringent kontrolliert wird wie in anderen Organismen, so gibt es auch in murinen Embryonen morphogenetische Gradienten, die den genauen Bereich des Prozesses festlegt, sodass nur in einer bestimmten Zellpopulation der essentielle Vorgang der EMT (Epithelial-Mesenchymale-Transition) eingeleitet wird (Lim and Thiery 2012). Eine genauere Erläuterung der Gastrulation ist in der Einleitung dieser Arbeit (siehe 1.1.2) zu finden.

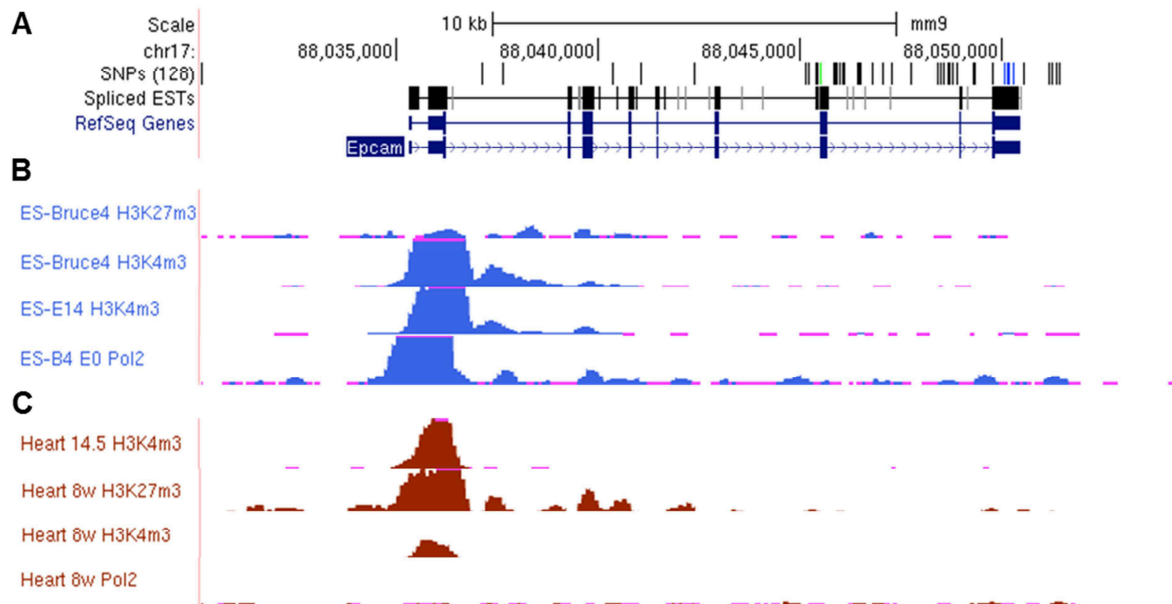
EpCAM ist bereits in sehr frühen Stadien, noch vor der Gastrulation, in befruchteten Oozyten, dem Zweizellstadium und der Morula nachweisbar. Nicht alle Zellen der Morula allerdings exprimieren das Protein, wobei die positiven Zellen eine starke Variabilität in der Höhe der Expression aufweisen (Tarmann *et al.* 1990). Anders als in adulten Geweben oder Organismen ist EpCAM in den Stadien der frühen Embryogenese nicht auf Epithelien begrenzt (Trzpis *et al.* 2008a). Vielmehr ist das Protein in frühen Embryonalstadien der Maus am stärksten im Endoderm (Sherwood *et al.* 2007), aber auch in der gesamten Organogenese in endodermalen Geweben exprimiert (Sherwood *et al.* 2009). Dies ist neben dem Gewebe der Leber beispielsweise das des Pankreas oder des Darms. So wurden in der Entwicklung des Pankreas ausgesprochen dynamische Schwankungen der EpCAM Menge, mit der höchsten Expression in dicht gedrängten Inselzellen, beobachtet. In adulten Geweben hingegen zeichneten sich diese Zellen, anders als die Kanäle des Pankreas, mit geringer Expression aus (Cirulli *et al.* 1998).

Wie der Blick auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Mausembryos in Abbildung 4.25 und ein detaillierter Vergleich aller Gewebe der drei Stadien (siehe Abbildung 4.27, Abbildung 4.28, Abbildung 4.29) zeigt, gab es eine Plastizität in der Expression von EpCAM, die anhand der Zu- und Abnahme des Proteins innerhalb der drei untersuchten Entwicklungsphasen dargestellt ist. Es gab einerseits Gewebe, in welchen die EpCAM Expression innerhalb der gesamten Differenzierungsprozesse nicht oder nur marginal verändert wurde, wie beispielsweise die Auskleidungen des Pharynx oder Larynx, aber auch das EpCAM negative Gehirngewebe. Andererseits fanden sich auch Gewebe, die die Expression in Folge der Entwicklung in die eine oder andere Richtung veränderten. Nicht nur die Schilddrüse, Teile des Thymus oder die Krypten des Kolon, sondern auch die Lunge wiesen im pränatalen, lebensfähigen

Stadium (E18.5) eine *de novo* Expression auf. Eine Expression von EpCAM in der frühen Entwicklung der Lunge wurde bereits beschrieben (Trzpis *et al.* 2008a). Die Leber dagegen zeigte das Gegenteil, nämlich eine negative Regulation im Verlauf der Differenzierung von einem stark positiven fötalen Gewebe (siehe Abbildung 4.27 (F)) hin zum maturen, EpCAM negativen Organ (siehe Abbildung 4.29). Derartige Veränderungen im Expressionsmuster sind nicht nur für EpCAM, sondern unter anderem auch für N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), ein homophiles Zelladhäsionsprotein auf Neuronen, Gliazellen, Skelettmuskel- und NK Zellen, bekannt (Abbate *et al.* 1999). Und auch im Bereich der malignen Transformationen sind diese aberranten Expressionen für die meisten Zelladhäsionsmoleküle charakteristisch (Trzpis *et al.* 2007a). Die Entwicklung der murinen Leber aus dem Endoderm des Darmrohrs, beginnend in Phase E8.5, setzt durch induzierende Signale, wie Wachstumsfaktoren (Fgf), ein, die von der angrenzenden Herzanlage ausgesendet werden (Douarin 1975, Gualdi *et al.* 1996, Jung *et al.* 1999). Zusammen mit weiteren Faktoren (BMP; *bone morphogenic protein*) (Rossi *et al.* 2001) induzieren diese Wachstumsfaktoren die Proliferation der Lebervorläuferzellen, die daraufhin die Leberknospe ausbilden (E8.5- E9.0). Der Verlust der Basalmembran um diese Knospung (E9.5) ist gefolgt von einer Migration dieser Zellen in das umgebende Mesenchym des *Septum transversum*, dem Vorläufer des Zwerchfells (Zaret 1998, Sosa-Pineda *et al.* 2000, Matsumoto *et al.* 2001). Die Vorläuferzellen, auch Hepatoblasten genannt, können sowohl zu Hepatozyten, wie auch zu Cholangiozyten (Gallenepithelzellen) differenzieren (Germain *et al.* 1988, Shiojiri *et al.* 1991, Shiojiri 1994, Rogler 1997, Spagnoli *et al.* 1998). Diese Zellen, auch in der adulten Leber zu finden, werden vermutlich als Reservoir zur Erhaltung der Homöostase des Organs im Falle einer massiven Lebernekrose verwendet (Dabeva and Shafritz 1993, Fausto *et al.* 1993). Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die transiente EpCAM Expression zu Beginn der Organogenese die Identifikation und Isolation der Hepatoblasten erstmals im Entwicklungsstadium E11.5 ermöglichte (Tanaka *et al.* 2009). Dieselbe Arbeitsgruppe postulierte EpCAM deshalb als den frühesten transienten Marker für Hepatoblasten in der Leberentwicklung. Erstaunlicherweise aber konnte die starke und vollständige Expression des Proteins in der fötalen Leber in der vorliegenden Arbeit schon deutlich früher, im

Entwicklungsstadium E9.5, beobachtet werden (siehe Abbildung 4.27 (**F**)). Die Färbungen des letzten untersuchten, pränatalen Stadiums dagegen deckten sich mit Erkenntnissen anderer Wissenschaftler. Hier waren nur die Gallenepithelzellen des Gallengangs (siehe Abbildung 4.29 (**G**)) positiv gefärbt (de Boer *et al.* 1999, Hreha *et al.* 1999).

In dieser Arbeit wurden außerdem das Herz und dessen Anlagen in den Stadien E9.5 und E12.5 näher analysiert. Wie die Übersicht (siehe Abbildung 4.26) der eben genannten Phasen zeigt, war das Protein weder in den Anlagen des Organs, noch im maturen Organ des Tieres zu erkennen. Die fehlende Expression von EpCAM im Gewebe des adulten murinen Herzens wurde bereits beschrieben (Kosterink *et al.* 2007), jedoch ist darüber hinaus nichts in der Literatur bezüglich der EpCAM Expression in der Organogenese des Herzens zu finden. Allerdings unterstreichen ChIP Daten aus einer öffentlichen Datenbank (siehe *UCSC Genome Browser*) die Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Abbildung 5.1). Während an den *Epcam* Promotor pluripotenter Zellen nur die Bindung der aktivierenden epigenetischen Modifikation H3K4me3 und der RNA Polymerase Pol II zu vermerken ist, wird die Transkription des Gens nicht durch negative Modifikationen, wie die Methylierung des Histon 3 am Lysin 27, gehemmt (siehe (**B**)). Diese hemmende Trimethylierung jedoch ist sowohl für das fötale (E14.5), wie auch das adulte (8w) Herz zu erkennen. Dagegen ist die aktivierende Bindung von H3K4me3 an den Promotor als nur gering, von Pol II als nicht vorhanden einzustufen (siehe (**C**)), was mit einem Erliegen der Transkription und somit mit einem Fehlen des EpCAM Proteins im adulten Herzen einhergeht. Somit brachten die Färbungen des Organs neue Erkenntnisse über EpCAM in der embryonalen Herzentwicklung.



**Abbildung 5.1: Chromatin Immunopräzipitation am *Epcam* Promotor von pluripotenten Stammzellen und Zellen des fötalen und adulten Herzens (Datenbank USCS Genome Browser).**

Die Daten der ChIP am *Epcam* Promotor (A) von drei verschiedenen pluripotenten embryonalen Stammzelllinien (B) und von Zellen des fötalen oder muren Herzens (C) wurden der Datenbank *UCSC Genome Browser* entnommen. Präzipitiert wurden epigenetische Modifikationen (H3K27me3, H3K4me3) sowie gebundene RNA Polymerase Pol II. Die Höhe der Kurven weist auf die Interaktionsstärke der Modifikationen oder der Pol II mit dem Promotor hin.

## 5.4 EpCAM Überexpression hat positiven Einfluss auf die endodermale Differenzierung

Sowohl zur Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Pools an pluripotenten Stammzellen, wie auch in der Entwicklung der Organe oder Erhaltung der Homöostase eines adulten Gewebes spielt die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Zellen eine überaus wichtige Rolle. So ist die Ausgeglichenheit zwischen diesen beiden Prozessen auch für die Generierung der richtigen Anzahl von Vorläuferzellen im korrekten zeitlichen Verlauf verantwortlich (Blanpain and Simons 2013). Deshalb war die Analyse des korrekten Ablaufs der Morphogenese und der zellulären Signale und Faktoren, die diese Prozesse steuern, jeher von großer Bedeutung in der Entwicklungsbiologie (Nowotschin and Hadjantonakis 2010). Im Folgenden soll daher die Entwicklung aller Keimblätter und Zwischenstufen, aber

auch der extraembryonalen Zelllinien, wie das Trophoektoderm erläutert werden. Ihre jeweilige Abstammung ist in Abbildung 1.2 schematisch zusammengefasst.

Wie bereits in 5.3 erklärt, besteht die späte Blastozyste mit extraembryonalem Trophoektoderm, dem Epiblasten und dem primitiven Endoderm, die zusammen die Innere Zellmasse bilden, aus drei verschiedenen Zelltypen. Neben dem Chorion, entsteht aus dem Trophoektoderm der ekto-plazentale Kegel und das extraembryonale Ektoderm. Mit ihm zusammen schließt das primitive Endoderm den Epiblasten ein, der den eigentlichen Embryo ausbilden wird, aus dem wiederum die Gewebe der adulten Maus und der fötale Teil der Plazenta hervorgehen. Dabei kapselt das viszerale Endoderm, dessen Ursprung ebenso wie das parietale im primitiven Endoderm liegt, den Epiblasten distal, das extraembryonale Ektoderm proximal ein, wobei dies eine vertikale Achse durch den radiären Eizylinder ist, der aus der sich verlängernden Blastozyste entsteht. Die Bildung des *primitive streak* innerhalb des Epiblasten, einer morphologisch ausgeprägten Struktur, das die Symmetrie des Embryos ausschaltet, definiert den genauen Bereich der Gastrulation. Im Verlauf dieses Prozesses, schematisch dargestellt in Abbildung 1.3, differenziert die epitheliale Zellschicht des Epiblasten zum einen in das mesenchymale embryonale Mesoderm, zum anderen in das epitheliale definitive Endoderm. Die erste aus dem *primitive streak* des Epiblasten gebildete Zelllinie ist das extraembryonale Mesoderm, welchem das Chorion, der Dottersack und die Blutinseln entspringen (Lu *et al.* 2001, Nowotschin and Hadjantonakis 2010, Saiz and Plusa 2013).

Mit dem in Teil 4.4 detailliert beschriebenen cDNA Array der Firma Roche wurden neben Stammzell-spezifischen Genen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen auch charakteristische Marker für die eben aufgelisteten Keimblätter und Zelllinien der Embryonalentwicklung hinsichtlich der Regulation in Folge der exogenen EpCAM Expression und Differenzierung analysiert. Wie bereits für Oct3/4 gesehen (siehe Abbildung 4.17), hatte die hohe EpCAM Menge keinen signifikanten Einfluss auf das Expressionsmuster Stammzell-spezifischer Gene (siehe Abbildung 4.30) oder Pluripotenz-erhaltender Transkriptionsfaktoren (siehe Abbildung 4.31). Dafür konnten Auswirkungen der EpCAM Überexpression auf einige Zytokine und Wachstumsfaktoren, Fgf5, Fgf4 und Nodal1, gemessen werden (siehe Abbildung

4.32 oder Abbildung 4.33). Diese Signalmoleküle, die an Tag 21 der Differenzierung in der Überexpressionszelllinie in erhöhter Menge vorlagen, dienen der Erhaltung der Pluripotenz, aber auch der Steuerung der Zelllinienspezifikation (Vallier *et al.* 2004, Lanner and Rossant 2010, Zheng *et al.* 2010). Anders als die Marker Eomes und Gcm, die zur Analyse des Trophoektoderms, auch Trophoblast genannt, verwendet wurden, zeigte die Auswertung der Messung von zwei weiteren Genen, Cdx2 und Krt, bezüglich der exogenen EpCAM Menge einen Unterschied in der Expressionshöhe (siehe Abbildung 4.34). Interessanterweise wurde 2009 in homozygot EpCAM negativen Mäusen eine Reduktion der parietalen Trophoblast-Riesenzellen in der Plazenta entdeckt (Nagao *et al.* 2009). Die Gruppe behauptete weiter, dass EpCAM für das Überleben dieses Zelltyps benötigt wird.

Auch für Marker des Endoderms konnte ein Anstieg der Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 4.38) und validiert (siehe Abbildung 4.40) werden. Sowohl Afp, wie auch Foxa2 lagen im Falle der exogenen EpCAM Expression erhöht vor. Deshalb kann von einer induzierenden Wirkung von EpCAM auf die endodermal-gerichtete Entwicklung der Zellen ausgegangen werden. Das zweite aus dem Epiblasten entstandene Keimblatt, das Mesoderm, unterlag, wie die Validierung zweier Marker (Col1a1 und Wt1) zeigte, vermutlich einer hemmenden Regulation durch EpCAM (siehe Abbildung 4.40). Allerdings bedarf es noch einer Bestätigung in Form von Analysen weiterer mesodermaler Gene. Kontrovers aber sehr interessant dagegen war das Expressionsmuster kardiomyozitärer oder Muskel-spezifischer Gene wie Myog, Myf5, Myod1 oder Nkx2.5 (siehe Abbildung 4.35 (**A**, **B**) und Abbildung 4.36 (**B**)). Obwohl die Überexpression von EpCAM im Verlauf der Differenzierung eine verminderte Entwicklung von Kardiomyozyten und damit eine verringerte Kontraktilität hervorrief, war die Expression dieser Gene durchweg stark gesteigert. Dies warf natürlich die Frage auf, wie die Zelle trotz einer solch hohen Menge an Transkript, nicht in der Lage sein konnte, die Spezifikation zu Kardiomyozyten zu durchlaufen. Möglicherweise aber war der Effekt von EpCAM auf die kardiomyozitäre Differenzierung ausschließlich indirekt. Oder aber es kam in der Zelle zu einer Überkompensation, die zu der Transkripterhöhung führte, um so eine verspätete Entwicklung zu forcieren. Denkbar wären auch ein Block in der Entwicklungsphase, der trotz starker Expression von Myog, Myf5, Myod1 und Nkx2.5 nicht überwunden



werden kann, oder eine zeitlich verschobene Expression dieser Gene. Der genauen Ursache muss in zukünftigen Versuchen nachgegangen werden. Neben kardialen Zellen haben auch die Zellen des Endothels ihren Ursprung im Mesoderm (Van Vliet *et al.* 2012). Die Durchführung des Arrays und die Analyse einiger Endothelspezifischer Marker konnte allerdings keine veränderte Expression in der Zelllinie mit exogen exprimiertem EpCAM erkennen. Die ektodermale Neuronalentwicklung wies im Array kein einheitliches Regulationsmuster für die Gene Nes, Neurod1 und Pax6 auf (siehe Abbildung 4.39 (A)). So zeigten alle drei Gene durch die exogene Expression von EpCAM eine unterschiedliche Beeinflussung ihrer Expression. Die Validierung von Nes und Pax6 in Abbildung 4.40 (C) konnte zwar ein gleichartiges Bild erzeugen, jedoch schien die Überexpression keine Auswirkungen auf diese Gene oder möglicherweise sogar auf die Entwicklung des ektodermalen Keimblatts zu besitzen, was allerdings, wie bereits für das mesodermale besprochen, in folgenden Arbeiten zu bestätigen ist.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das *singlespan* Transmembranprotein EpCAM ist ein epithelial exprimiertes Molekül, das homophile Zelladhäsion steuert und vermittelt. Das Protein ist nicht nur auf Tumoren verschiedenster Entitäten, sondern auch in gesunden Geweben in unterschiedlicher Stärke exprimiert. In den letzten Jahren wurde eine starke Expression von EpCAM in TICs (*tumor initiating cells*) dazu verwendet, diese zu isolieren und anschließend zu identifizieren. Sie sind als die Ursache von Tumoren, Metastasierung und Rezidiv bekannt und deshalb in der Krebsforschung und der Medizin von großem Interesse. Darüber hinaus wurde das Protein vor wenigen Jahren als Marker für humane und später auch für murine Stammzellen identifiziert. Seine positive Korrelation mit einer Dedifferenzierung und einer damit einhergehenden Expression verschiedener Stammzellgene machte EpCAM zum geeigneten Pluripotenzenmarker in murinen pluripotenten Zellen. Die Letalität homozygot EpCAM negativer Mäuse und das Auftreten einer humanen Erkrankung, CTE (*congenital tufting enteropathy*), als postnatale Todesursache, wiesen dem Protein auch in der Embryonalentwicklung eine große Bedeutung zu. In dieser Arbeit wurde deshalb die Embryonalentwicklung der Maus *in vivo* hinsichtlich der EpCAM Expression analysiert. Weiterhin wurde eine Methode zur dreidimensionalen Differenzierung verwendet, die die embryonale Entwicklung *in vitro* mittels embryoid bodies simuliert und so eine Charakterisierung von EpCAM während dieses Vorgangs ermöglichte. Folgende wesentliche Ergebnisse wurden dabei erzielt:

- Die *in vitro* Differenzierung der Zelllinie E14TG2α geht mit einem Verlust der Expression von Stammzellmarkern (SSEA-1, Oct3/4) und von EpCAM einher.
- In Korrelation mit dem Grad der Differenzierung konnten epigenetische Modifikationen in Form von Trimethylierungen des Histons 3 an Lysin 4 und 27 und eine verminderte Bindung der RNA Polymerase Pol II an den *Epcam* Promotor nachgewiesen werden.

- Mit fortschreitender Differenzierung konnte immunhistochemisch ein vollständiger Verlust von EpCAM im Kern und eine basolaterale Expression des Proteins in den umrandenden Zellen von *embryoid bodies* nachgewiesen werden.
- Die exogene Expression von EpCAM hatte keinen Effekt auf die Morphologie oder die Anzahl der gebildeten *embryoid bodies*, konnte aber die Differenzierung von ES Zellen zu Kardiomyozyten hemmen bzw. verlangsamen.
- Auf transkriptioneller Ebene wiesen kontraktile *embryoid bodies* weniger Oct3/4 und EpCAM und mehr  $\alpha$ -CAA auf.
- Ein cDNA Array zeigte, dass die Überexpression von EpCAM eine endodermal gerichtete Differenzierung der Zellen zur Folge hatte.
- Die Färbungen von Embryos der Entwicklungsstufen E9.5, E12.5 und E18.5 demonstrierten die hohe Plastizität des EpCAM Proteins in fötalen und pränatalen Geweben.

## 7 SUMMARY

The single-span transmembrane protein EpCAM is expressed in epithelia, where it regulates and mediates the homophilic cell-cell adhesion. The protein is not only expressed on carcinomas of various localizations, but also to a weaker extent on healthy tissues. In the last few years, the strong expression of EpCAM was used for isolation and identification of TICs (tumor initiating cells). These cells are suggested to be the actual origin of tumors, metastasis and relapse and therefore are of special interest for tumor research and medicine. Furthermore, EpCAM was identified a few years ago as a marker for human and murine embryonic stem (ES) cells. In both, human and murine ES cells, EpCAM marks cells with a pluripotent phenotype, and genetic deletion of it resulted in embryonal lethality and severe post-natal, lethal disorders associated with colon leakiness known as congenital tufting enteropathy (CTE). Therefore, the expression and function of murine EpCAM in the three-dimensional differentiation of ES cells and during embryogenesis *in vivo* were addressed in the present thesis.

The following major results were obtained:

- In vitro differentiation of E14TG2 $\alpha$  ES cells was accompanied by a loss of EpCAM along with stem cell specific markers such as SSEA-1, Oct3/4 in embryoid bodies (EBs).
- Down-regulation of EpCAM expression was the result of epigenetic modifications (histone 3 lysine 4 and 27 trimethylations) and a reduced binding of RNA Polymerase Pol II to the *Epcam* promoter.
- EpCAM expression throughout EBs was heterogeneous. Cells located in the core of EBs completely ceased to express EpCAM, whereas cells forming the external rim displayed a strong, basolateral expression and an epithelial phenotype.
- Exogenous expression of EpCAM had no detectable effect on the morphology and number of generated EBs, but was shown to transiently block

differentiation of ES cells to cardiomyocytes. These findings were supported by changes in the levels of specific markers such as Oct3/4 and  $\alpha$ -cardiac actin ( $\alpha$ -CAA).

- A cDNA array analysis disclosed a shift of cells ectopically expressing EpCAM towards endodermal differentiation at the expense of mesodermal traits.
- The plasticity of EpCAM expression as observed in EBs was confirmed in mouse embryos at developmental stages E9.5, E12.5 and E18.5. Early in embryogenesis, EpCAM expression was completely shut down in meso- and ectodermal tissue such as heart and brain, but remained in epithelial linings of the embryo and commonly in tissues of endodermal origin including colonic and lung epithelia.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbate, M., Brown, D., Bonventre, J.V., 1999. Expression of ncam recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol* 277 (3 Pt 2), F454-63.
- Aguilar-Gallardo, C., Simón, C., 2013. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin Reprod Med* 31 (01), 005-013.
- Aiken, C.E., Swoboda, P.P., Skepper, J.N., Johnson, M.H., 2004. The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction* 128 (5), 527-35.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (7), 3983-8.
- Alberti, S., Nutini, M., Herzenberg, L.A., 1994. DNA methylation prevents the amplification of trop1, a tumor-associated cell surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (13), 5833-7.
- Alexopoulou, A.N., Couchman, J.R., Whiteford, J.R., 2008. The cmv early enhancer/chicken beta actin (cag) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* 9, 2.
- Anderson, R., Schaible, K., Heasman, J., Wylie, C., 1999. Expression of the homophilic adhesion molecule, ep-cam, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil* 116 (2), 379-84.
- Arnold, S.J., Robertson, E.J., 2009. Making a commitment: Cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2), 91-103.
- Baeuerle, P.A., Gires, O., 2007. Epcam (cd326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96 (3), 417-23.
- Bai, H., Sakurai, T., Godkin, J.D., Imakawa, K., 2013. Expression and potential role of gata factors in trophoblast development. *J Reprod Dev* 59 (1), 1-6.
- Balzar, M., Bakker, H.A., Briaire-De-Brujin, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., Litvinov, S.V., 1998. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 18 (8), 4833-43.
- Balzar, M., Briaire-De Brujin, I.H., Rees-Bakker, H.A., Prins, F.A., Helfrich, W., De Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S.O., Fleuren, G.J., Litvinov, S.V., 2001. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of ep-cam molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 21 (7), 2570-80.
- Balzar, M., Prins, F.A., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., Litvinov, S.V., 1999a. The structural analysis of adhesions mediated by ep-cam. *Exp Cell Res* 246 (1), 108-21.

- Balzar, M., Winter, M.J., De Boer, C.J., Litvinov, S.V., 1999b. The biology of the 17-1a antigen (ep-cam). *J Mol Med (Berl)* 77 (10), 699-712.
- Barrera, L.O., Li, Z., Smith, A.D., Arden, K.C., Cavenee, W.K., Zhang, M.Q., Green, R.D., Ren, B., 2008. Genome-wide mapping and analysis of active promoters in mouse embryonic stem cells and adult organs. *Genome Research* 18 (1), 46-59.
- Bergsagel, P.L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C.R., Trepel, J., Kuehl, W.M., 1992. A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol* 148 (2), 590-6.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125 (2), 315-26.
- Betschinger, J., Knoblich, J.A., 2004. Dare to be different: Asymmetric cell division in drosophila, c. Elegans and vertebrates. *Current Biology* 14 (16), R674-R685.
- Bhaijee, F., Pepper, D.J., Pitman, K.T., Bell, D., 2012. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A review of current knowledge and future applications. *Head Neck* 34 (6), 894-9.
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., Eichler, H., 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22 (4), 625-34.
- Blanpain, C., Simons, B.D., 2013. Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (8), 489-502.
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.-T., Anisimov, S.V., Wobus, A.M., 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research* 91 (3), 189-201.
- Boiani, M., Scholer, H.R., 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (11), 872-84.
- Bolos, V., Blanco, M., Medina, V., Aparicio, G., Diaz-Prado, S., Grande, E., 2009. Notch signalling in cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 11 (1), 11-9.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122 (6), 947-56.
- Bremer, E., Kuijlen, J., Samplonius, D., Walczak, H., De Leij, L., Helfrich, W., 2004a. Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scfv:Strail fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen egp2. *Int J Cancer* 109 (2), 281-90.
- Bremer, E., Samplonius, D., Kroesen, B.J., Van Genne, L., De Leij, L., Helfrich, W., 2004b. Exceptionally potent anti-tumor bystander activity of an scfv:Strail fusion protein with specificity for egp2 toward target antigen-negative tumor cells. *Neoplasia* 6 (5), 636-45.
- Breuhahn, K., Baeuerle, P.A., Peters, M., Prang, N., Tox, U., Kohne-Volland, R., Dries, V., Schirmacher, P., Leo, E., 2006. Expression of epithelial cellular adhesion molecule (ep-cam) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 34 (1), 50-6.
- Brinster, R.L., 1974. Embryo development. *Journal of Animal Science* 38 (5), 1003-1012.

- Bumol, T.F., Marder, P., Deherdt, S.V., Borowitz, M.J., Apeltgren, L.D., 1988. Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the ks1/4 monoclonal antibody. *Hybridoma* 7 (4), 407-15.
- Burness, M.L., Sipkins, D.A., 2010. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Biol* 20 (2), 107-15.
- Burridge, P.W., Keller, G., Gold, J.D., Wu, J.C., 2012. Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* 10 (1), 16-28.
- Calabrese, G., Crescenzi, C., Morizio, E., Palka, G., Guerra, E., Alberti, S., 2001. Assignment of *tacstd1* (alias *trop1*, *m4s1*) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of *tacstd2* (alias *trop2*, *m1s1*) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 92 (1-2), 164-5.
- Carpenter, G., Red Brewer, M., 2009. Epcam: Another surface-to-nucleus missile. *Cancer Cell* 15 (3), 165-6.
- Carson, D.D., Bagchi, I., Dey, S.K., Enders, A.C., Fazleabas, A.T., Lessey, B.A., Yoshinaga, K., 2000. Embryo implantation. *Developmental Biology* 223 (2), 217-237.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional expression cloning of *nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113 (5), 643-55.
- Chau, C.H., Figg, W.D., 2012. Angiogenesis inhibitors increase tumor stem cells. *Cancer Biology & Therapy* 13 (8), 586-587.
- Chaubal, S., Wollenberg, B., Kastenbauer, E., Zeidler, R., 1999. Ep-cam--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from scch. *Anticancer Res* 19 (3B), 2237-42.
- Chaves-Perez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harreus, U., Gires, O., 2013. Epcam regulates cell cycle progression via control of cyclin d1 expression. *Oncogene* 32 (5), 641-50.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., Rossant, J., 2006. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the *grb2*-*mapk* pathway. *Dev Cell* 10 (5), 615-24.
- Cherry, A.B., Daley, G.Q., 2012. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* 148 (6), 1110-22.
- Chhabra, P., Brayman, K.L., 2013. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Translational Medicine* 2 (5), 328-336.
- Chong, J.M., Speicher, D.W., 2001. Determination of disulfide bond assignments and n-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen ga733-2 (co17-1a, *egp*, *ks1-4*, *ksa*, and *ep-cam*). *J Biol Chem* 276 (8), 5804-13.
- Choo, A.B., Tan, H.L., Ang, S.N., Fong, W.J., Chin, A., Lo, J., Zheng, L., Hentze, H., Philp, R.J., Oh, S.K., Yap, M., 2008. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26 (6), 1454-63.
- Chumsri, S., Phatak, P., Edelman, M.J., Khakpour, N., Hamburger, A.W., Burger, A.M., 2007. Cancer stem cells and individualized therapy. *Cancer Genomics - Proteomics* 4 (3), 165-174.
- Cimpean, A.M., Suciuc, C., Ceausu, R., Tatucu, D., Muresan, A.M., Raica, M., 2008. Relevance of the immunohistochemical expression of cytokeratin 8/18 for the



- diagnosis and classification of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 49 (4), 479-83.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G.M., Mally, M.I., Lopez, A.D., Fannon, A., Ptaszniak, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., Ellisman, M., Reisfeld, R.A., Hayek, A., 1998. Ksa antigen ep-cam mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: Morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140 (6), 1519-34.
- Cirulli, V., Ricordi, C., Hayek, A., 1995. E-cadherin, ncam, and epcam expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc* 27 (6), 3335.
- Clevers, H., 2011. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat Med* 17 (3), 313-9.
- Cross, J.C., 2005. How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice – a review. *Placenta* 26, Supplement (0), S3-S9.
- Cross, J.C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani, M., Adamson, S.L., 2002. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 (1–2), 207-212.
- Dabeva, M.D., Shafritz, D.A., 1993. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the d-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143 (6), 1606-20.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C., Clarke, M.F., 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (24), 10158-63.
- Damonte, P., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Keister, B.A., Cardiff, R.D., 2007. Emt tumorigenesis in the mouse mammary gland. *Lab Invest* 87 (12), 1218-26.
- Dan, Y.Y., Riehle, K.J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J.S., Fausto, N., 2006. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (26), 9912-7.
- De Boer, C.J., Van Krieken, J.H., Janssen-Van Rhijn, C.M., Litvinov, S.V., 1999. Expression of ep-cam in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 188 (2), 201-6.
- Denzel, S., Maetzel, D., Mack, B., Eggert, C., Barr, G., Gires, O., 2009. Initial activation of epcam cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 9, 402.
- Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P., Gassmann, M., 2000. Embryoid bodies: An in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85 (6), 645-51.
- Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H., 2004. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews* 25 (3), 341-373.
- Di Paolo, C., Willuda, J., Kubetzko, S., Lauffer, I., Tschudi, D., Waibel, R., Pluckthun, A., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U., 2003. A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. *Clin Cancer Res* 9 (7), 2837-48.
- Diaz-Guerra, M., Haddow, S., Bauluz, C., Jorcano, J.L., Cano, A., Balmain, A., Quintanilla, M., 1992. Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring harvey ras gene alterations. *Cancer Res* 52 (3), 680-7.

- Dietrich, J.E., Hiiragi, T., 2007. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 134 (23), 4219-31.
- Ding, Y., Gan, Y., Feng, J.B., Qi, S.H., Li, R.M., Li, D.S., 0000. Efficient isolation inner cell mass from blastocysts by improved microsurgical technique. *Cell Res* 18 (S1), S39-S39.
- Donovan, P.J., Gearhart, J., 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414 (6859), 92-7.
- Douarin, N.M., 1975. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 53 (6), 427-55.
- Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., Mack, B., Baldus, S.A., Hoya, V., Pietsch, J.M., Panagiotidou, P., Raba, K., Vay, C., Vallbohmer, D., Harreus, U., Knoefel, W.T., Stoecklein, N.H., Gires, O., 2013. Context-dependent adaption of epcam expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*.
- Driesen, R.B., Verheyen, F.K., Debie, W., Blaauw, E., Babiker, F.A., Cornelussen, R.N., Ausma, J., Lenders, M.H., Borgers, M., Chaponnier, C., Ramaekers, F.C., 2009. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *J Cell Mol Med* 13 (5), 896-908.
- Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., Clarke, M.F., Hoey, T., Lewicki, J., Gurney, A.L., 2008. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 3 (6), e2428.
- Enver, T., Pera, M., Peterson, C., Andrews, P.W., 2009. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell* 4 (5), 387-97.
- Evans, M., 2011. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (10), 680-6.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (5819), 154-6.
- Fausto, N., Lemire, J.M., Shiojiri, N., 1993. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 204 (3), 237-41.
- Fernandez Tde, S., De Souza Fernandez, C., Mencalha, A.L., 2013. Human induced pluripotent stem cells from basic research to potential clinical applications in cancer. *Biomed Res Int* 2013, 430290.
- Flatmark, K., Guldvik, I.J., Svensson, H., Fleten, K.G., Florenes, V.A., Reed, W., Giercksky, K.E., Fodstad, O., Andersson, Y., 2013. Immunotoxin targeting epcam effectively inhibits peritoneal tumor growth in experimental models of mucinous peritoneal surface malignancies. *Int J Cancer* 133 (6), 1497-506.
- Fong, D., Steurer, M., Obrist, P., Barbieri, V., Margreiter, R., Amberger, A., Laimer, K., Gastl, G., Tzankov, A., Spizzo, G., 2008. Ep-cam expression in pancreatic and ampullary carcinomas: Frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* 61 (1), 31-5.
- Forbes, S., Vig, P., Poulsom, R., Thomas, H., Alison, M., 2002. Hepatic stem cells. *J Pathol* 197 (4), 510-8.
- Frame, F.M., Maitland, N.J., 2011. Cancer stem cells, models of study and implications of therapy resistance mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 720, 105-18.

- Gai, H., Leung, E.L., Costantino, P.D., Aguila, J.R., Nguyen, D.M., Fink, L.M., Ward, D.C., Ma, Y., 2009. Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. *Cell Biol Int* 33 (11), 1184-93.
- Gaiser, M.R., Lammermann, T., Feng, X., Igyarto, B.Z., Kaplan, D.H., Tessarollo, L., Germain, R.N., Udey, M.C., 2012. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (epcam; cd326) enables epidermal langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (15), E889-97.
- Gallicano, G.I., 2013. Modeling to optimize terminal stem cell differentiation. *Scientifica* 2013, 20.
- Gardner, R.L., Brook, F.A., 1997. Reflections on the biology of embryonic stem (es) cells. *Int J Dev Biol* 41 (2), 235-43.
- Gasperowicz, M., Natale, D.R.C., 2011. Establishing three blastocyst lineages—then what? *Biology of Reproduction* 84 (4), 621-630.
- Germain, L., Blouin, M.J., Marceau, N., 1988. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 48 (17), 4909-18.
- Gires, O., 2008. Epcam (tumor-associated calcium signal transducer 1). *Genet Cytogenet Oncol Haematol* (February 2008). <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/TACSTD1ID42459ch2p21.html>.
- Gires, O., 2011. Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci* 68 (24), 4009-22.
- Gires, O., 2012. Epcam in hepatocytes and their progenitors. *J Hepatol* 56 (2), 490-2.
- Gires, O., Eskofier, S., Lang, S., Zeidler, R., Munz, M., 2003. Cloning and characterisation of a 1.1 kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter. *Anticancer Res* 23 (4), 3255-61.
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Munz, M., Wollenberg, B., Zeidler, R., 2001. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer* 92 (3), 620-8.
- Goel, S., Bauer, R.J., Desai, K., Bulgaru, A., Iqbal, T., Strachan, B.K., Kim, G., Kaubisch, A., Vanhove, G.F., Goldberg, G., Mani, S., 2007. Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ing-1, a human engineered monoclonal antibody targeting human epcam, in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 18 (10), 1704-7.
- Gonzalez, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M., Gires, O., 2009. Epcam is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells* 27 (8), 1782-91.
- Gorges, T., Tinhofer, I., Drosch, M., Rose, L., Zollner, T., Krahn, T., Von Ahsen, O., 2012. Circulating tumour cells escape from epcam-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12 (1), 178.
- Gostner, J.M., Fong, D., Wrulich, O.A., Lehne, F., Zitt, M., Hermann, M., Krobisch, S., Martowicz, A., Gastl, G., Spizzo, G., 2011. Effects of epcam overexpression on human breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 11, 45.
- Gottlinger, H., Johnson, J., Riethmuller, G., 1986a. Biochemical and epitope analysis of the 17-1a membrane antigen. *Hybridoma* 5 Suppl 1, S29-37.

- Gottlinger, H.G., Funke, I., Johnson, J.P., Gokel, J.M., Riethmuller, G., 1986b. The epithelial cell surface antigen 17-1a, a target for antibody-mediated tumor therapy: Its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 38 (1), 47-53.
- Goulet, O., Salomon, J., Ruemmele, F., De Serres, N.P., Brousse, N., 2007. Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis* 2, 20.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Horisberger, B., Schmid, C., Passweg, J., Urbano-Ispizua, A., Accreditation Committee of the European Group For, B., Marrow, T., 2002. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in europe. *Blood* 100 (7), 2374-86.
- Gu, B., Lee, M.G., 2013. Histone h3 lysine 4 methyltransferases and demethylases in self-renewal and differentiation of stem cells. *Cell & Bioscience* 3 (1), 39.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., Zaret, K.S., 1996. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: Cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10 (13), 1670-82.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130 (1), 77-88.
- Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G.M., Piantelli, M., Alberti, S., 2012. Mtrop1/epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal e-cadherin/beta-catenin. *PLoS One* 7 (11), e49302.
- Hachmeister, M., Bobowski, K.D., Hogl, S., Dislich, B., Fukumori, A., Eggert, C., Mack, B., Kremling, H., Sarrach, S., Coscia, F., Zimmermann, W., Steiner, H., Lichtenthaler, S.F., Gires, O., 2013. Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mepcam. *PLoS ONE* 8 (8), e71836.
- Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S., Dey, S.K., 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (28), 10326-31.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1), 57-70.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., Van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., Van Oudenaarden, A., Jaenisch, R., 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462 (7273), 595-601.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch, R., 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with ips cells generated from autologous skin. *Science* 318 (5858), 1920-3.
- Hanna, J.H., Saha, K., Jaenisch, R., 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143 (4), 508-25.
- Harvey, P.A., Leinwand, L.A., 2011. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of Cell Biology* 194 (3), 355-365.
- Hazeltine, L.B., Badur, M.G., Lian, X., Das, A., Han, W., Palecek, S.P., 2013. Temporal impact of substrate mechanics on differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Acta Biomaterialia* (0).

- He, J.Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J.A., Kamp, T.J., 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: Action potential characterization. *Circ Res* 93 (1), 32-9.
- Hemler, M.E., 2001. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 155 (7), 1103-7.
- Hemler, M.E., 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (10), 801-11.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., Koprowski, H., 1979. Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (3), 1438-42.
- Hermann, P.C., Bhaskar, S., Cioffi, M., Heeschen, C., 2010. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 20 (2), 77-84.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., Heeschen, C., 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1 (3), 313-23.
- Hirai, H., Karian, P., Kikyo, N., 2011. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochemical Journal* 438 (1), 11-23.
- Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H., Aizawa, S., 2008. Epb41l5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology* 182 (6), 1217-1230.
- Hong, S., Hwang, D.-Y., Yoon, S., Isacson, O., Ramezani, A., Hawley, R.G., Kim, K.-S., 2007. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther* 15 (9), 1630-1639.
- Hreha, G., Jefferson, D.M., Yu, C.H., Grubman, S.A., Alsabeh, R., Geller, S.A., Vierling, J.M., 1999. Immortalized intrahepatic mouse biliary epithelial cells: Immunologic characterization and immunogenicity. *Hepatology* 30 (2), 358-71.
- Hsiao, C., Palecek, S.P., 2012. Microwell regulation of pluripotent stem cell self-renewal and differentiation. *Bionanoscience* 2 (4), 266-276.
- Huang, H.P., Chen, P.H., Yu, C.Y., Chuang, C.Y., Stone, L., Hsiao, W.C., Li, C.L., Tsai, S.C., Chen, K.Y., Chen, H.F., Ho, H.N., Kuo, H.C., 2011. Epithelial cell adhesion molecule (epcam) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem* 286 (38), 33520-32.
- Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C., Jacob, F., 1980. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21 (3), 927-34.
- Imrich, S., Hachmeister, M., Gires, O., 2012. Epcam and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* 6 (1), 30-8.
- Inaba, M., Yamashita, Y.M., 2012. Asymmetric stem cell division: Precision for robustness. *Cell Stem Cell* 11 (4), 461-9.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N., 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6 (2), 88-95.
- Jaenisch, R., Young, R., 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132 (4), 567-82.

- Jiang, H., Shukla, A., Wang, X., Chen, W., Bernstein, B., Roeder, R., 2011. Role for dpy-30 in es cell-fate specification by regulation of h3k4 methylation within bivalent domains. *Cell* 144, 513 - 525.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C.M., 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30 (8), 896-904.
- Johnson, M.H., 2009. From mouse egg to mouse embryo: Polarities, axes, and tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 483-512.
- Johnson, M.H., Ziemek, C.A., 1981. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24 (1), 71-80.
- Jojovic, M., Adam, E., Zangemeister-Wittke, U., Schumacher, U., 1998. Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: An investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J* 30 (10), 723-9.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., Zaret, K.S., 1999. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284 (5422), 1998-2003.
- Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D., Muller, M., 1995. Distribution of e-cadherin and ep-cam in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol* 103 (4), 281-6.
- Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L., Strasser, A., 2007. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317 (5836), 337.
- Kim, J.S., Choi, H.W., Choi, S., Do, J.T., 2011. Reprogrammed pluripotent stem cells from somatic cells. *Int J Stem Cells* 4 (1), 1-8.
- Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Field, L.J., 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98 (1), 216-24.
- Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., Kurosawa, H., 2007. Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J Biosci Bioeng* 104 (4), 294-9.
- Kosterink, J.G.W., Mclaughlin, P.M.J., Lub-De Hooge, M.N., Hendrikse, H.H., Van Zanten, J., Van Garderen, E., Harmsen, M.C., De Leij, L.F.M.H., 2007. Biodistribution studies of epithelial cell adhesion molecule (epcam)-directed monoclonal antibodies in the epcam-transgenic mouse tumor model. *The Journal of Immunology* 179 (2), 1362-1368.
- Kuhn, S., Koch, M., Nubel, T., Ladwein, M., Antolovic, D., Klingbeil, P., Hildebrand, D., Moldenhauer, G., Langbein, L., Franke, W.W., Weitz, J., Zoller, M., 2007. A complex of epcam, claudin-7, cd44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 5 (6), 553-67.
- Kurosaka, S., Kashina, A., 2008. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 84 (2), 102-122.
- Kurosawa, H., 2007. Methods for inducing embryoid body formation: In vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 103 (5), 389-98.
- Labalette, C., Renard, C.A., Neuveut, C., Buendia, M.A., Wei, Y., 2004. Interaction and functional cooperation between the lim protein fhl2, cbp/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 24 (24), 10689-702.

- Lal, M., Caplan, M., 2011. Regulated intramembrane proteolysis: Signaling pathways and biological functions. *Physiology (Bethesda)* 26 (1), 34-44.
- Lanner, F., Rossant, J., 2010. The role of fgf/erk signaling in pluripotent cells. *Development* 137 (20), 3351-60.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J.C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X.L., Kato, I., Williams, D.A., Dick, J.E., 1996. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating nod/scid mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nat Med* 2 (12), 1329-37.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., Ku, S., Martynova, M., Semechkin, R., Galat, V., Gottesfeld, J., Izpisua Belmonte, J.C., Murry, C., Keirstead, H.S., Park, H.S., Schmidt, U., Laslett, A.L., Muller, F.J., Nievergelt, C.M., Shamir, R., Loring, J.F., 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human escs and ipscs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8 (1), 106-18.
- Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.F., Lanza, F., Boucheix, C., Rubinstein, E., 2006. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5 (5), 845-57.
- Lee, J.D., Silva-Gagliardi, N.F., Tepass, U., Mcglade, C.J., Anderson, K.V., 2007. The ferm protein epb4.1l5 is required for organization of the neural plate and for the epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak of the mouse embryo. *Development* 134 (11), 2007-2016.
- Lehtonen, E., 1980. Changes in cell dimensions and intercellular contacts during cleavage-stage cell cycles in mouse embryonic cells. *J Embryol Exp Morphol* 58, 231-49.
- Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., Yashiro, K., Tsukita, S., Hamada, H., 2012. Epcam contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol* 371 (2), 136-45.
- Lenstra, Tineke I., Benschop, Joris j., Kim, T., Schulze, Julia m., Brabers, Nathalie a.C.H., Margaritis, T., Van de pasch, Loes a.L., Van heesch, Sebastiaan a.a.C., Brok, Mariel o., Groot koerkamp, Marian j.A., Ko, Cheuk w., Van leenen, D., Sameith, K., Van hooff, Sander r., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Hentrich, T., Kobor, Michael s., Buratowski, S., Holstege, Frank c.P., 2011. The specificity and topology of chromatin interaction pathways in yeast. *Molecular Cell* 42 (4), 536-549.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M., 2007a. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* 67 (3), 1030-1037.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M., 2007b. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67 (3), 1030-7.
- Li, L., Xie, T., 2005. Stem cell niche: Structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (1), 605-631.
- Li, L., Zheng, P., Dean, J., 2010. Maternal control of early mouse development. *Development* 137 (6), 859-70.

- Li, M., Zhang, D., Hou, Y., Jiao, L., Zheng, X., Wang, W.-H., 2003. Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 65 (4), 429-434.
- Lim, J., Thiery, J.P., 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development. *Development* 139 (19), 3471-3486.
- Linnenbach, A.J., B.A., S., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., J.J., P., Druck, T., Huebner, K., 1993. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Biol Cell* 13(3), 1507-1515.
- Litvinov, S.V., Bakker, H.A., Gourevitch, M.M., Velders, M.P., Warnaar, S.O., 1994a. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (ep-cam) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2 (5), 417-28.
- Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-De Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., 1997. Epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139 (5), 1337-48.
- Litvinov, S.V., Van Driel, W., Van Rhijn, C.M., Bakker, H.A., Van Krieken, H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., 1996. Expression of ep-cam in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 148 (3), 865-75.
- Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., 1994b. Ep-cam: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125 (2), 437-46.
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., Wagers, A., 2010. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 92, 367-409.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M.F., 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 675-99.
- Lobuglio, A., Saleh, M., Braddock, J., Lampkin, T., Khor, S., Wissel, P., Al., E., 1997. A phase i trial of the humanized anti-egp40 monoclonal antibody 3622w94. *Proc am Soc Clin Oncol* 16:436.
- Lu, C.C., Brennan, J., Robertson, E.J., 2001. From fertilization to gastrulation: Axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11 (4), 384-92.
- Lu, T.Y., Lu, R.M., Liao, M.Y., Yu, J., Chung, C.H., Kao, C.F., Wu, H.C., 2010. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 285 (12), 8719-32.
- Lu, X., Kang, Y., 2009. Cell fusion as a hidden force in tumor progression. *Cancer Res* 69 (22), 8536-9.
- Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., Bollong, M., Kunick, C., Brinker, A., Cho, C.Y., Schultz, P.G., Jaenisch, R., 2009. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (22), 8912-7.
- Maaser, K., Borlak, J., 2008. A genome-wide expression analysis identifies a network of epcam-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer* 99 (10), 1635-43.
- Madan, P., Rose, K., Watson, A.J., 2007. Na/k-atpase  $\beta$ 1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* 282 (16), 12127-12134.



- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., Gires, O., 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen epcam. *Nat Cell Biol* 11 (2), 162-71.
- Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J., 1994. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circulation Research* 75 (2), 233-44.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., Blasco, M.A., 2009. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure ips cell genomic integrity. *Nature* 460 (7259), 1149-53.
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., Von Der Mark, K., Starzinski-Powitz, A., Wixler, V., 2002. The lim-only protein fhl2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* 159 (1), 113-22.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12), 7634-8.
- Martowicz, A., Rainer, J., Lelong, J., Spizzo, G., Gastl, G., Untergasser, G., 2013. Epcam overexpression prolongs proliferative capacity of primary human breast epithelial cells and supports hyperplastic growth. *Molecular Cancer* 12 (1), 56.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., Yokota, T., 1999. Stat3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18 (15), 4261-9.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., Zaret, K.S., 2001. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294 (5542), 559-63.
- Mcculloch, E.A., Till, J.E., 2005. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med* 11 (10), 1026-8.
- Mclaughlin, P.M.J., Trzpis, M., Kroesen, B.-J., Helfrich, W., Terpstra, P., Dokter, W.H.A., Ruiters, M.H.J., De Leij, L.F.M.H., Harmsen, M.C., 2004. Use of the egp-2/ep-cam promoter for targeted expression of heterologous genes in carcinoma derived cell lines. *Cancer Gene Ther* 11 (9), 603-612.
- Medina, V., Calvo, M.B., Diaz-Prado, S., Espada, J., 2009. Hedgehog signalling as a target in cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 11 (4), 199-207.
- Meh, P., Pavsic, M., Turk, V., Baici, A., Lenarcic, B., 2005. Dual concentration-dependent activity of thyroglobulin type-1 domain of testican: Specific inhibitor and substrate of cathepsin L. *Biol Chem* 386 (1), 75-83.
- Migeotte, I., Omelchenko, T., Hall, A., Anderson, K.V., 2010. Rac1-dependent collective cell migration is required for specification of the anterior-posterior body axis of the mouse. *PLoS Biol* 8 (8), e1000442.
- Mikawa, T., Poh, A.M., Kelly, K.A., Ishii, Y., Reese, D.E., 2004. Induction and patterning of the primitive streak, an organizing center of gastrulation in the amniote. *Dev Dyn* 229 (3), 422-32.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E.,

- O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., Bernstein, B.E., 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448 (7153), 553-560.
- Miller, J.P., Yeh, N., Vidal, A., Koff, A., 2007. Interweaving the cell cycle machinery with cell differentiation. *Cell Cycle* 6 (23), 2932-2938.
- Min, I.M., Waterfall, J.J., Core, L.J., Munroe, R.J., Schimenti, J., Lis, J.T., 2011. Regulating rna polymerase pausing and transcription elongation in embryonic stem cells. *Genes & Development* 25 (7), 742-754.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and es cells. *Cell* 113 (5), 631-42.
- Mlastyle, "The 2012 nobel prize in physiology or medicine - press release". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web. 4 Dec 2013. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/press.html)>.
- Mogi, A., Ichikawa, H., Matsumoto, C., Hieda, T., Tomotsune, D., Sakaki, S., Yamada, S., Sasaki, K., 2009. The method of mouse embryoid body establishment affects structure and developmental gene expression. *Tissue and Cell* 41 (1), 79-84.
- Moitra, K., Lou, H., Dean, M., 2011. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: Insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 89 (4), 491-502.
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R., Hammerling, G.J., 1987. Epithelium-specific surface glycoprotein of mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* 56 (6), 714-21.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., 1982. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 (1), 11-24.
- Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J., Moller, P., 1987. Immunohistochemical study of the expression of a mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 47 (11), 2883-91.
- Mosolits, S., Markovic, K., Frodin, J.E., Virving, L., Magnusson, C.G., Steinitz, M., Fagerberg, J., Mellstedt, H., 2004. Vaccination with ep-cam protein or anti-idiotypic antibody induces th1-biased response against mhc class i- and ii-restricted ep-cam epitopes in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 10 (16), 5391-402.
- Motosugi, N., Bauer, T., Polanski, Z., Solter, D., Hiiragi, T., 2005. Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 19 (9), 1081-92.
- Mueller, M.T., Hermann, P.C., Heeschen, C., 2010. Cancer stem cells as new therapeutic target to prevent tumour progression and metastasis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2, 602-13.
- Mummery, C., Van Der Heyden, M.A., De Boer, T.P., Passier, R., Ward, D., Van Den Brink, S., Van Rooijen, M., Van De Stolpe, A., 2007. Cardiomyocytes from human and mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Med* 140, 249-72.

- Munz, M., Baeuerle, P.A., Gires, O., 2009. The emerging role of epcam in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69 (14), 5627-9.
- Munz, M., Fellingner, K., Hofmann, T., Schmitt, B., Gires, O., 2008. Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen epcam. *Front Biosci* 13, 5195-201.
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., Gires, O., 2004. The carcinoma-associated antigen epcam upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23 (34), 5748-58.
- Munz, M., Murr, A., Kvesic, M., Rau, D., Mangold, S., Pflanz, S., Lumsden, J., Volkland, J., Fagerberg, J., Riethmuller, G., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A., Raum, T., 2010. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-epcam monoclonal antibodies. *Cancer Cell Int* 10, 44.
- Munz, M., Zeidler, R., Gires, O., 2005. The tumour-associated antigen epcam upregulates the fatty acid binding protein e-fabp. *Cancer Lett* 225 (1), 151-7.
- Myster, D.L., Duronio, R.J., 2000. To differentiate or not to differentiate? *Curr Biol* 10 (8), R302-4.
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M.B., Hanson, J.C., Morasso, M.I., Tessarollo, L., Mackem, S., Udey, M.C., 2009. Abnormal placental development and early embryonic lethality in epcam-null mice. *PLoS One* 4 (12), e8543.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18), 8424-8.
- Ng, V.Y., Ang, S.N., Chan, J.X., Choo, A.B., 2010. Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28 (1), 29-35.
- Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., Eaves, C.J., 2012. Cancer stem cells: An evolving concept. *Nat Rev Cancer* 12 (2), 133-43.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., Smith, A., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4. *Cell* 95 (3), 379-91.
- Nicolini, A., Ferrari, P., Fini, M., Borsari, V., Fallahi, P., Antonelli, A., Berti, P., Carpi, A., Miccoli, P., 2011a. Stem cells: Their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 12 (2), 196-205.
- Nicolini, A., Ferrari, P., Fini, M., Borsari, V., Fallahi, P., Antonelli, A., Carpi, A., Miccoli, P., 2011b. Cancer stem cells: Perspectives of new therapeutical approaches for breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1486-99.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of es cells. *Nat Genet* 24 (4), 372-6.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., Rossant, J., 2005. Interaction between oct3/4 and cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123 (5), 917-29.
- Nowotschin, S., Hadjantonakis, A.K., 2010. Cellular dynamics in the early mouse embryo: From axis formation to gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 20 (4), 420-7.

- Nubel, T., Preobraschenski, J., Tuncay, H., Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L., Zoller, M., 2009. Claudin-7 regulates epcam-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res* 7 (3), 285-99.
- O'brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E., 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445 (7123), 106-10.
- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., Miyajima, A., 2009. Potential hepatic stem cells reside in epcam+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136 (11), 1951-60.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., Hamada, H., 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60 (3), 461-72.
- Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 1 (1), 103-11.
- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J., Gillanders, W.E., 2004. Epcam is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64 (16), 5818-24.
- Ou, D.-B., Zeng, D., Jin, Y., Liu, X.-T., Teng, J.-W., Guo, W.-G., Wang, H.-T., Su, F.-F., He, Y., Zheng, Q.-S., 2013. The long-term differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes: An indirect co-culture model. *PLoS ONE* 8 (1), e55233.
- Paria, B.C., Reese, J., Das, S.K., Dey, S.K., 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: Advances and challenges. *Science* 296 (5576), 2185-2188.
- Patriarca, C., Macchi, R.M., Marschner, A.K., Mellstedt, H., 2012. Epithelial cell adhesion molecule expression (cd326) in cancer: A short review. *Cancer Treat Rev* 38 (1), 68-75.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R., Gires, O., 2003. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule epcam in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* 193 (1), 25-32.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143-7.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.K., 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135 (18), 3081-91.
- Poelmann, R.E., 1980. Differential mitosis and degeneration patterns in relation to the alterations in the shape of the embryonic ectoderm of early post-implantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 55, 33-51.
- Qu, X., Liu, T., Song, K., Li, X., Ge, D., 2012. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions. *PLoS ONE* 7 (10), e48161.
- Raff, M., 2003. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 1-22.
- Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M., Aalto-Setälä, K., 2011. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells. *Stem Cells International* 2011.

- Ralhan, R., Cao, J., Lim, T., Macmillan, C., Freeman, J.L., Walfish, P.G., 2010. Epcam nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer* 10, 331.
- Rao, C., Chianese, D., Doyle, G., Miller, M., Russell, T., Sanders, R., Terstappen, L., 2005. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumours. *Int J Oncol* 27, 49 - 57.
- Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434 (7035), 843-50.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nüsse, R., Weissman, I.L., 2003. A role for wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423 (6938), 409-14.
- Reya, T., Morrison, S., Clarke, M., Weissman, I., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105 - 111.
- Richard, V., Nair, M.G., Santhosh Kumar, T.R., Pillai, M.R., 2013. Side population cells as prototype of chemoresistant, tumor-initiating cells. *BioMed Research International* 2013, 8.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H., Lindhofer, H., 2001. Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha epcam x alpha cd3). *J Histochem Cytochem* 49 (7), 911-7.
- Rivera-Perez, J.A., Mager, J., Magnuson, T., 2003. Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev Biol* 261 (2), 470-87.
- Roche, E., Sepulcre, P., Reig, J.A., Santana, A., Soria, B., 2005. Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *The FASEB Journal* 19 (10), 1341-1343.
- Rogler, L.E., 1997. Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. *Am J Pathol* 150 (2), 591-602.
- Rosen, J.M., Jordan, C.T., 2009. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324 (5935), 1670-3.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., Staudt, L.M., 1990. A pou-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345 (6277), 686-92.
- Rossant, J., Tam, P.P., 2009. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 136 (5), 701-13.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., Zaret, K.S., 2001. Distinct mesodermal signals, including bmps from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15 (15), 1998-2009.
- Rungarunlert, S., Techakumphu, M., Pirity, M.K., Dinnyes, A., 2009. Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells* 1 (1), 11-21.
- Ruzicka, D.L., Schwartz, R.J., 1988. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol* 107 (6 Pt 2), 2575-86.
- Saini, V., Shoemaker, R.H., 2010. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells. *Cancer Sci* 101 (1), 16-21.
- Saiz, N., Plusa, B., 2013. Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction* 145 (3), R65-R80.

- Sajini, A.A., Greder, L.V., Dutton, J.R., Slack, J.M.W., 2012. Loss of oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. *Developmental Biology* 371 (2), 170-179.
- Salter, B., Salter, C., 2007. Bioethics and the global moral economy: The cultural politics of human embryonic stem cell science. *Science, Technology & Human Values* 32 (5), 554-581.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A.H., 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of wnt signaling by a pharmacological gsk-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10 (1), 55-63.
- Sawyers, C.L., Denny, C.T., Witte, O.N., 1991. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 64 (2), 337-50.
- Scheunemann, P., Stoecklein, N.H., Rehders, A., Bidde, M., Metz, S., Peiper, M., Eisenberger, C.F., Schulte Am Esch, J., Knoefel, W.T., Hosch, S.B., 2008. Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 393 (3), 359-65.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N., Furth, M.E., Reid, L.M., 2007. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204 (8), 1973-87.
- Schnell, U., Cirulli, V., Giepmans, B.N., 2013a. Epcam: Structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1828 (8), 1989-2001.
- Schnell, U., Kuipers, J., Giepmans, B.N., 2013b. Epcam proteolysis: New fragments with distinct functions? *Biosci Rep*.
- Schon, M.P., Schon, M., Mattes, M.J., Stein, R., Weber, L., Alberti, S., Klein, C.E., 1993. Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen mh 99/ks 1/4. *Int J Cancer* 55 (6), 988-95.
- Schrode, N., Xenopoulos, P., Piliszek, A., Frankenberg, S., Plusa, B., Hadjantonakis, A.K., 2013. Anatomy of a blastocyst: Cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis* 51 (4), 219-33.
- Seligson, D.B., Pantuck, A.J., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, M.H., Han, K.R., Correa, A.J., Eeva, M., Tze, S., Belldegrun, A.S., Figlin, R.A., 2004. Epithelial cell adhesion molecule (ksa) expression: Pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10 (8), 2659-69.
- Sell, S., Pierce, G.B., 1994. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 70 (1), 6-22.
- Serrano, L., Vazquez, B.N., Tischfield, J., 2013. Chromatin structure, pluripotency and differentiation. *Experimental Biology and Medicine* 238 (3), 259-270.
- Sharpless, N.E., Depinho, R.A., 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9), 703-713.
- Sheng, C.C., Zhou, L., Hao, J., 2013. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *Biomed Res Int* 2013, 547902.
- Sherwood, R.I., Chen, T.Y., Melton, D.A., 2009. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. *Dev Dyn* 238 (1), 29-42.
- Sherwood, R.I., Jitianu, C., Cleaver, O., Shaywitz, D.A., Lamenzo, J.O., Chen, A.E., Golub, T.R., Melton, D.A., 2007. Prospective isolation and global gene

- expression analysis of definitive and visceral endoderm. *Dev Biol* 304 (2), 541-55.
- Shiojiri, N., 1994. Transient expression of bile-duct-specific cytokeratin in fetal mouse hepatocytes. *Cell Tissue Res* 278 (1), 117-23.
- Shiojiri, N., Lemire, J.M., Fausto, N., 1991. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 51 (10), 2611-20.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., Cantley, L.C., 2013. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140 (12), 2535-2547.
- Sims, R., Nishioka, K., Reinberg, D., 2003. Histone lysine methylation: A signature for chromatin function. *Trends Genet* 19, 629 - 639.
- Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., Terada, N., 2007. A heterogeneous expression pattern for nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25 (10), 2534-42.
- Sivagnanam, M., Mueller, J.L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S.F., Turner, D., Zlotkin, S.H., Pencharz, P.B., Ngan, B.Y., Libiger, O., Schork, N.J., Lavine, J.E., Taylor, S., Newbury, R.O., Kolodner, R.D., Hoffman, H.M., 2008. Identification of epcam as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology* 135 (2), 429-37.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336 (6200), 688-90.
- Smith, L.J., 1980. Embryonic axis orientation in the mouse and its correlation with blastocyst relationships to the uterus. Part 1. Relationships between 82 hours and 4 1/4 days. *J Embryol Exp Morphol* 55, 257-77.
- Smith, R., McLaren, A., 1977. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *J Embryol Exp Morphol* 41, 79-92.
- Snow, M.H., Tam, P.P., 1979. Is compensatory growth a complicating factor in mouse teratology? *Nature* 279 (5713), 555-7.
- Solter, D., Knowles, B.B., 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (11), 5565-9.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J.T., Oliver, G., 2000. Hepatocyte migration during liver development requires prox1. *Nat Genet* 25 (3), 254-5.
- Spagnoli, F.M., Amicone, L., Tripodi, M., Weiss, M.C., 1998. Identification of a bipotential precursor cell in hepatic cell lines derived from transgenic mice expressing cyto-met in the liver. *J Cell Biol* 143 (4), 1101-12.
- Spizzo, G., Obrist, P., Ensinger, C., Theurl, I., Dunser, M., Ramoni, A., Gunsilius, E., Eibl, G., Mikuz, G., Gastl, G., 2002. Prognostic significance of ep-cam and her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 98 (6), 883-8.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G., Zeimet, A.G., 2006. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 103 (2), 483-8.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., Von Castelberg, B., Bart, R., Stopatschinskaya, S., Kochli, O.R., Haas, P., Mross, F., Zuber, M., Dietrich, H., Bischoff, S., Mirlacher, M., Sauter, G., Gastl, G., 2004. High ep-cam expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86 (3), 207-13.

- Stevens, L.C., Little, C.C., 1954. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40 (11), 1080-7.
- Steward, M., Sridhar, A., Meyer, J., 2013. Neural regeneration. In: Heber-Katz, E., Stocum, D.L. eds. *New perspectives in regeneration*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 163-191.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., Emerman, J.T., 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 67 (2), 93-109.
- Stockley, J.H., O'Neill, C., 2008. Understanding bace1: Essential protease for amyloid- $\beta$  production in alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (20), 3265-3289.
- Strnad, J., Hamilton, A.E., Beavers, L.S., Gamboa, G.C., Apelgren, L.D., Taber, L.D., Sportsman, J.R., Bumol, T.F., Sharp, J.D., Gadski, R.A., 1989. Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA. *Cancer Res* 49 (2), 314-7.
- Sun, Y.-F., Xu, Y., Yang, X.-R., Guo, W., Zhang, X., Qiu, S.-J., Shi, R.-Y., Hu, B., Zhou, J., Fan, J., 2013. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology* 57 (4), 1458-1468.
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., Linnenbach, A.J., 1990. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen ga733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (9), 3542-6.
- Taipale, J., Beachy, P.A., 2001. The hedgehog and wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411 (6835), 349-54.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861-872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006a. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663 - 676.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006b. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4), 663-676.
- Takaoka, K., Hamada, H., 2012. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development* 139 (1), 3-14.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., Ivy, S.P., 2011a. Targeting cancer stem cells by inhibiting wnt, notch, and hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 8 (2), 97-106.
- Takebe, N., Warren, R.Q., Ivy, S.P., 2011b. Breast cancer growth and metastasis: Interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res* 13 (3), 211.
- Takes, R.P., Baatenburg De Jong, R.J., Wijffels, K., Schuurin, E., Litvinov, S.V., Hermans, J., Van Krieken, J.H., 2001. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* 194 (3), 298-302.
- Tam, P.P., 1988. Postimplantation development of mitomycin c-treated mouse blastocysts. *Teratology* 37 (3), 205-12.



- Tam, P.P., Behringer, R.R., 1997. Mouse gastrulation: The formation of a mammalian body plan. *Mech Dev* 68 (1-2), 3-25.
- Tam, P.P.L., Loebel, D.a.F., 2007. Gene function in mouse embryogenesis: Get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 8 (5), 368-381.
- Tanaka, M., Okabe, M., Suzuki, K., Kamiya, Y., Tsukahara, Y., Saito, S., Miyajima, A., 2009. Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of epcam and dlk1: Drastic change of epcam expression during liver development. *Mechanisms of Development* 126 (8-9), 665-676.
- Tang, X.M., Beesley, J.S., Grinspan, J.B., Seth, P., Kamholz, J., Cambi, F., 1999. Cell cycle arrest induced by ectopic expression of p27 is not sufficient to promote oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biochem* 76 (2), 270-9.
- Tarkowski, A.K., Wroblewska, J., 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18 (1), 155-80.
- Tarkowski, A.K., Wróblewska, J., 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 18 (1), 155-180.
- Tarmann, T., Dohr, G., Schiechl, H., Barth, S., Hartmann, M., 1990. Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel)* 137 (2), 141-5.
- Thampoe, I.J., Ng, J.S., Lloyd, K.O., 1988. Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: Differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys* 267 (1), 342-52.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 (3), 503-12.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145-1147.
- Trosko, J.E., 2009. Review paper: Cancer stem cells and cancer nonstem cells: From adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells. *Vet Pathol* 46 (2), 176-93.
- Trounson, A., 2006. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev* 27 (2), 208-19.
- Trzpis, M., Bremer, E., McLaughlin, P.M., De Leij, L.F., Harmsen, M.C., 2008a. Epcam in morphogenesis. *Front Biosci* 13, 5050-5.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., De Leij, L.M., Harmsen, M.C., 2007a. Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171 (2), 386-95.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., Van Goor, H., Brinker, M.G., Van Dam, G.M., De Leij, L.M., Popa, E.R., Harmsen, M.C., 2008b. Expression of epcam is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol* 216 (2), 201-8.
- Trzpis, M., Popa, E.R., McLaughlin, P.M., Van Goor, H., Timmer, A., Bosman, G.W., De Leij, L.M., Harmsen, M.C., 2007b. Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (epcam/egp-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol* 107 (4), e119-31.
- Tsubura, A., Senzaki, H., Sasaki, M., Hilgers, J., Morii, S., 1992. Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-

- associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 19 (1), 73-9.
- Vallier, L., Reynolds, D., Pedersen, R.A., 2004. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Developmental Biology* 275 (2), 403-421.
- Van Den Berg, D.L., Snoek, T., Mullin, N.P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., Poot, R.A., 2010. An oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6 (4), 369-81.
- Van Der Gun, B.T., Melchers, L.J., Ruiters, M.H., De Leij, L.F., Mclaughlin, P.M., Rots, M.G., 2010. Epcam in carcinogenesis: The good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 31 (11), 1913-21.
- Van Vliet, P., Wu, S.M., Zaffran, S., Puceat, M., 2012. Early cardiac development: A view from stem cells to embryos. *Cardiovasc Res* 96 (3), 352-62.
- Varga, A.C., Wrana, J.L., 2005. The disparate role of bmp in stem cell biology. *Oncogene* 24 (37), 5713-21.
- Varga, M., Obrist, P., Schneeberger, S., Muhlmann, G., Felgel-Farnholz, C., Fong, D., Zitt, M., Brunhuber, T., Schafer, G., Gastl, G., Spizzo, G., 2004. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 10 (9), 3131-6.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.-C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. B-secretase cleavage of alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science* 286 (5440), 735-741.
- Vassar, R., Kovacs, D.M., Yan, R., Wong, P.C., 2009. The beta-secretase enzyme bace in health and alzheimer's disease: Regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29 (41), 12787-94.
- Verfaillie, C.M., 2002. Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: A novel role for thrombopoietin. *The Journal of Clinical Investigation* 110 (3), 303-304.
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., Louvet-Vallee, S., 2005. Asymmetric distribution of par proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 282 (2), 307-19.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8 (10), 755-68.
- Wainwright, L.J., Lasorella, A., Iavarone, A., 2001. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (16), 9396-9400.
- Wang, H., Dey, S.K., 2006. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7 (3), 185-199.
- Wang, H., Ding, T., Brown, N., Yamamoto, Y., Prince, L.S., Reese, J., Paria, B.C., 2008. Zonula occludens-1 (zo-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Developmental Biology* 318 (1), 112-125.
- Wang, L., Menendez, P., Cerdan, C., Bhatia, M., 2005. Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. *Exp Hematol* 33 (9), 987-96.

- Wang, L.D., Wagers, A.J., 2011. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (10), 643-655.
- Wang, M.L., Chiou, S.H., Wu, C.W., 2013. Targeting cancer stem cells: Emerging role of nanog transcription factor. *Onco Targets Ther* 6, 1207-1220.
- Wang, X., Yang, P., 2008. In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mes) cells using the hanging drop method. *J Vis Exp* (17).
- Weinhold, B., Schratt, G., Arsenian, S., Berger, J., Kamino, K., Schwarz, H., Ruther, U., Nordheim, A., 2000. Srf(-/-) es cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J* 19 (21), 5835-44.
- Wenqi, D., Li, W., Shanshan, C., Bei, C., Yafei, Z., Feihu, B., Jie, L., Daiming, F., 2009. Epcam is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135 (9), 1277-85.
- Went, P., Dirnhofer, S., Salvisberg, T., Amin, M.B., Lim, S.D., Diener, P.A., Moch, H., 2005. Expression of epithelial cell adhesion molecule (epcam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 29 (1), 83-8.
- Went, P., Vasei, M., Bubendorf, L., Terracciano, L., Tornillo, L., Riede, U., Kononen, J., Simon, R., Sauter, G., Baeuerle, P.A., 2006. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target ep-cam in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 94 (1), 128-35.
- Went, P.T.H., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., Dirnhofer, S., 2004. Frequent epcam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology* 35 (1), 122-128.
- Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'connor, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G., Nisula, B.C., 1988. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 319 (4), 189-94.
- Willem, M., Lammich, S., Haass, C., 2009. Function, regulation and therapeutic properties of  $\beta$ -secretase (bace1). *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2), 175-182.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M., 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336 (6200), 684-7.
- Winter, M.J., Cirulli, V., Briaire-De Bruijn, I.H., Litvinov, S.V., 2007. Cadherins are regulated by ep-cam via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem* 302 (1-2), 19-26.
- Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E., Rees-Bakker, H.A., Briaire-De Bruijn, I.H., Litvinov, S.V., 2003a. Expression of ep-cam shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285 (1), 50-8.
- Winter, M.J., Nagtegaal, I.D., Van Krieken, J.H., Litvinov, S.V., 2003b. The epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163 (6), 2139-48.
- Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., Schoneich, J., 1984. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152 (1), 212-9.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J., 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic

- responses to adrenergic and cholinergic agents and  $Ca^{2+}$  channel blockers. *Differentiation* 48 (3), 173-182.
- Wu, C.J., Mannan, P., Lu, M., Udey, M.C., 2013. Epithelial cell adhesion molecule (epcam) regulates claudin dynamics and tight junctions. *J Biol Chem* 288 (17), 12253-68.
- Wu, S.M., Choo, A.B., Yap, M.G., Chan, K.K., 2010. Role of sonic hedgehog signaling and the expression of its components in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 4 (1), 38-49.
- Xu, C., Police, S., Rao, N., Carpenter, M.K., 2002. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91 (6), 501-8.
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R.O., Rossant, J., 2006. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235 (9), 2301-14.
- Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., Wang, X.W., 2007. Activation of hepatic stem cell marker epcam by wnt- $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 67 (22), 10831-10839.
- Yamashita, T., Forgues, M., Wang, W., Kim, J.W., Ye, Q., Jia, H., Budhu, A., Zanetti, K.A., Chen, Y., Qin, L.X., Tang, Z.Y., Wang, X.W., 2008. Epcam and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68 (5), 1451-61.
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S.S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y., Takamura, H., Wang, X.W., Kaneko, S., 2013. Discrete nature of epcam+ and cd90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57 (4), 1484-97.
- Yamashita, T., Ji, J., Budhu, A., Forgues, M., Yang, W., Wang, H.Y., Jia, H., Ye, Q., Qin, L.X., Wauthier, E., Reid, L.M., Minato, H., Honda, M., Kaneko, S., Tang, Z.Y., Wang, X.W., 2009. Epcam-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 136 (3), 1012-24.
- Yang, F., Wu, M., Li, Y., Zheng, G.Y., Cao, H.Q., Sun, W., Yang, R., Zhang, H., Sheng, Y.H., Kong, X.Q., Tian, X.L., Zhou, L., 2013. Mutation p.S335x in gata4 reduces its DNA binding affinity and enhances cell apoptosis associated with ventricular septal defect. *Curr Mol Med* 13 (6), 993-9.
- Yang, Z.J., Wechsler-Reya, R.J., 2007. Hit 'em where they live: Targeting the cancer stem cell niche. *Cancer Cell* 11 (1), 3-5.
- Yi, S.-Y., Hao, Y.-B., Nan, K.-J., Fan, T.-L., 2013. Cancer stem cells niche: A target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treatment Reviews* 39 (3), 290-296.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., Smith, A., 2003. Bmp induction of id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with stat3. *Cell* 115 (3), 281-92.
- Yoon, S.M., Gerasimidou, D., Kuwahara, R., Hytioglou, P., Yoo, J.E., Park, Y.N., Theise, N.D., 2011. Epithelial cell adhesion molecule (epcam) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 53 (3), 964-73.
- Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype

- of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev* 45 (2), 163-71.
- Yu, F., Kuo, C.T., Jan, Y.N., 2006. *Drosophila* neuroblast asymmetric cell division: Recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* 51 (1), 13-20.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 (5858), 1917-1920.
- Yunta, M., Lazo, P.A., 2003. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 15 (6), 559-64.
- Zanna, P., Trerotola, M., Vacca, G., Bonasera, V., Palombo, B., Guerra, E., Rossi, C., Lattanzio, R., Piantelli, M., Alberti, S., 2007. Trop-1 are conserved growth stimulatory molecules that mark early stages of tumor progression. *Cancer* 110 (2), 452-64.
- Zaret, K., 1998. Early liver differentiation: Genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* 8 (5), 526-31.
- Zentner, G.E., Henikoff, S., 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 20 (3), 259-266.
- Zhang, J., Wilson, G.F., Soerens, A.G., Koonce, C.H., Yu, J., Palecek, S.P., Thomson, J.A., Kamp, T.J., 2009. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104 (4), e30-41.
- Zhang, X., Wen, H., Shi, X., 2012. Lysine methylation: Beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44 (1), 14-27.
- Zheng, Z., De longh, R.U., Rathjen, P.D., Rathjen, J., 2010. A requirement for fgf signalling in the formation of primitive streak-like intermediates from primitive ectoderm in culture. *PLoS ONE* 5 (9), e12555.
- Zhou, J., Yue, W., Pei, X., 2013. Advances in cell lineage reprogramming. *Sci China Life Sci* 56 (3), 228-33.
- Ziomek, C.A., Johnson, M.H., 1980. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 21 (3), 935-942.
- Zohn, I.E., Li, Y., Skolnik, E.Y., Anderson, K.V., Han, J., Niswander, L., 2006. P38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of e-cadherin during mouse gastrulation. *Cell* 125 (5), 957-969.
- Zorzos, J., Zizi, A., Bakiras, A., Pectasidis, D., Skarlos, D.V., Zorzos, H., Elemenoglou, J., Likourinas, M., 1995. Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody aua1 in bladder carcinoma: An immunohistochemical study. *Eur Urol* 28 (3), 251-4.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2), 211-28.

## 9 DANKSAGUNG

Den größten Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Olivier Gires aussprechen. Sein stetiges Vertrauen in mich und meine Arbeit ließen es zu, über mich hinauszuwachsen und in den letzten Jahren sehr viel zu lernen. Vielen Dank für das herausfordernde Thema, deine immer offene Tür und die fachlichen Gespräche, aber auch für die Freiheit, Entscheidungen selbst zu treffen!

Ich danke ganz besonders meinen Kollegen Matthias Hachmeister, Heidi Kremling, Carola Eggert, Brigitte Mack, Elisabeth Pfrogner, Gisela Kranz, Darko Libl, Karolina Bobowski und dem Rest der HNO Forschung. Ohne euch alle wäre es nicht halb so schön gewesen. Ich möchte euch für die Gespräche, das viele Lachen, die super Stimmung im Labor und eure Unterstützung danken! Matthias, dir gilt dabei der größte Dank, weil du mich drei Jahre lang, rund um die Uhr, ausgehalten und mich oft zum Lachen gebracht hast! Um es kurz zu machen: Nicht einmal im Traum hätte ich mir bessere Kollegen wünschen können!

Danken für die hervorragende (Team-) Arbeit möchte ich außerdem unserem Schneidemeister Darko Libl und unseren Färbeköniginnen Brigitte Mack und Gisela Kranz. Was würden wir alle ohne euch tun?

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, meine Eltern und deren Partner Toni und Yvonne und meine drei Geschwister. Vielen Dank für eure immerwährende Unterstützung auf meinem bisherigen Weg!

Ich möchte meinem Ehemann, Karol, für die letzten Jahre und seine immense Unterstützung danken. In Phasen des Zweifelns gabst du mir die Gewissheit das Richtige zu tun und die Energie weiterzumachen. P.S....